

105



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES "IZTACALA"

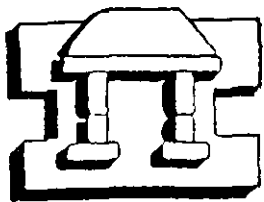
"EVALUACION DEL EFECTO GENOTOXICO DE ORTOFENILENEDIAMINA EN Drosophila melanogaster UTILIZANDO LA PRUEBA SMART EN CRUZAS E Y BE"

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE BIOL O G A P R E S E N T A GISELA EDITH RANGEL YESCAS

294084

DIRECTORA DE TESIS: BIOL. IRMA ELENA DUENAS GARCIA



IZTACALA

LOS REYES IZTACALA, EDO. DE MEX.

2001



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



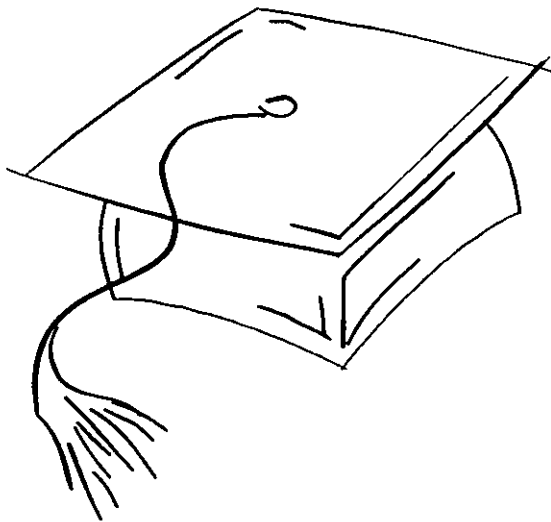
UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Ser joven es tener ideales y luchar por alcanzarlos es soñar con el futuro por que se trabaja en el presente, es tener siempre: algo que hacer, algo que crear y algo que dar...



A DIOS...

MÁS ¿CÓMO CORRESPONDER AL SEÑOR POR TODAS LAS MERCEDES QUE ME HA
HECHO?

Salmo, 114, 3.

A mis padres...

Celso y Natalia, por la vida, por su amor y por que me dieron toda la libertad de elegir mi camino.

Mami, para ti donde quiera que estés...

A mis hermanos...

Fernando, Adrián, Angeles, Jesús y Rodolfo, por que siempre estuvieron cuidando cada uno de mis pasos.

A mis cuñados...

Silvia, Georgina, Benjamin, Enriqueta y Rosa María, por su apoyo incondicional.

A mis sobrinos...

Jorge, Juanita, Jesús, Nancy y Linda por ser la motivación y la alegría de nuestras vidas.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México, por que desde el nivel bachillerato me abrió sus puertas y me permitió crecer como persona y formarme como bióloga.

A los profesores de la carrera de biología de la ENEP Iztacala, por que me brindaron sus conocimientos y su amistad.

A los sinodales de esta tesis, Biol. María Eugenia Heres Pulido, M. en C. Elias Piedra Ibarra, Biol. Laura Castañeda Partida y el Dr. Diego Arenas Aranda por su dedicación y sus comentarios que permitieron enriquecer este trabajo. Particularmente a la Biol. Irma Elena Dueñas García por su paciencia y dedicación en la dirección de esta tesis.

A los profesores Angel Durán Díaz y Agustín Vargas Vera, por su valiosa asesoría sobre la parte estadística de esta tesis, y al profesor Guillermo Avila Acevedo por la asesoría en la parte bioquímica.

Al Dr. Ulrich Graf del Institute of Toxicology, Swiss Federal Institute of Technology (ETH) and University of Zurich, Suiza, por la donación de los compuestos ortofenilenediamina y uretano utilizados en este trabajo, y por su asesoría general en la aplicación de la prueba SMART.

A mis compañeros del laboratorio de Genética Toxicológica de la ENEP Iztacala, Araceli, Clara, Laura, Héctor y Jesús, por los gratos momento que compartimos.

A todos aquellos que compartieron conmigo alguna clase o alguna práctica de campo, por los buenos momentos que vivimos juntos, particularmente a Alicia, Cony, Jazmin, Miriam Navarro, Alfredo Mendoza, Cuahutemoc y Sabas, por su amistad y por permitirme compartir con ellos la experiencia de ser estudiante de biología...

El presente trabajo forma parte de un proyecto que se está realizando en el Laboratorio de Genética Toxicológica de la Escuela Nacional de Estudios Profesionales, Iztacala, UNAM. En dicho proyecto se está evaluando el efecto genotóxico de una marca comercial de tinte para cabello y algunos de los componentes de la mezcla total, como lo es el ortofenilenediamina.

EVALUACIÓN DEL EFECTO GENOTÓXICO DE ORTOFENILENEDIAMINA EN *Drosophila melanogaster* UTILIZANDO LA PRUEBA SMART EN CRUZAS E Y BE

RESUMEN

La ortofenilenediamina (OFD) es una amina aromática utilizada como colorante intermediario en los tintes permanentes para cabello. Estudios epidemiológicos muestran una importante relación entre el uso de tintes y el desarrollo de diferentes tipos de cáncer. Así mismo, estudios experimentales han demostrado la penetración por piel de algunos componentes de los tintes. Sin embargo, en bioensayos a corto y a largo plazo, se han encontrado resultados contradictorios para este compuesto. Para contribuir con información sobre el efecto genotóxico positivo o negativo de esta amina, se aplicó la Prueba de Mutación y Recombinación Somática SMART en ala de *D. melanogaster*. Se probaron tres concentraciones oxidadas 1:1 con H₂O₂ al 6% (o) y sin oxidar (s/o) (OFD 0.6, 1.0 y 2.0 μM), empleando las cruza Estándar (E) y Bioactivación Elevada (BE) de manera simultánea en tres ensayos independientes con tres repeticiones cada uno. Las concentraciones de 0.6, 1.0 y 2.0 μM de OFD(s/o) utilizadas en la craza E, resultaron no genotóxicas para todas las categorías de manchas. Se encontraron resultados positivos en varias concentraciones de OFD(o) en ambas cruza; y en la craza BE(s/o). Por lo que se concluye que: el OFD sin oxidar actúa como promutágeno, ya que solo se muestra efectos en la craza BE. El OFD oxidado se comporta como mutágeno directo. La activación del OFD por el citocromo P450, incrementa el efecto genotóxico de esta amina.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	Página 1
Tintes	3
Ortofenilenediamina	5
ANTECEDENTES	9
Bioensayos a corto plazo	12
<i>Drosophila melanogaster</i>	13
Prueba de genotoxicidad SMART	16
JUSTIFICACIÓN	23
HIPÓTESIS	24
OBJETIVO	24
MATERIAL Y MÉTODOS	24
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	30
CONCLUSIONES	43
PROPUESTAS	44
BIBLIOGRAFÍA	45

EVALUACIÓN DEL EFECTO GENOTÓXICO DE ORTOFENILENEDIAMINA EN *Drosophila melanogaster*, UTILIZANDO LA PRUEBA SMART EN CRUZAS E Y BE”.

INTRODUCCIÓN

El extraordinario desarrollo de los productos químicos en el área farmacéutica, agrícola e industrial, ha ocasionado en los últimos años un incremento a corto, mediano y largo plazo, en el riesgo de intoxicación en el hombre. Bajo este contexto, la Toxicología, ha desarrollado diversos métodos para evaluar los daños que dichos compuestos pudieran causar sobre el organismo humano (Loomis, 1982). La genética toxicológica es el área que se encarga de analizar el efecto de un compuesto sobre el material hereditario, tratando de comprender los eventos que ocurren desde la interacción del DNA con el xenobiótico, hasta la expresión fenotípica del daño. (Vogel, 1991).

A través de estudios epidemiológicos de diversos cuadros clínicos, se ha determinado que algunos agentes químicos, pueden estar relacionados con enfermedades cuyo origen está en la alteración del material hereditario. A estos últimos se les ha denominado agentes genotóxicos, y pueden traer como consecuencia una mutación hereditaria o infertilidad cuando afecta a células germinales. En el caso de que el daño sea sobre células somáticas, éste no se verá reflejado en las siguientes generaciones. Si embargo, cuando la alteración se da en etapas tempranas del desarrollo de un organismo puede afectar su formación, y si el daño se presenta cuando el organismo ya es adulto, puede ser el origen de procesos malignos como muerte celular o cáncer (Vogel, *op cit*).

Los agentes genotóxicos, se pueden dividir en: **directos**, que interactúan con el material hereditario alterando la estructura o secuencia del ADN. Y los **indirectos** o promutágenos, los cuales requieren ser activados metabólicamente para tener efecto genotóxico (Fig.1).

METABOLISMO DE FÁRMACOS (Fig.1)

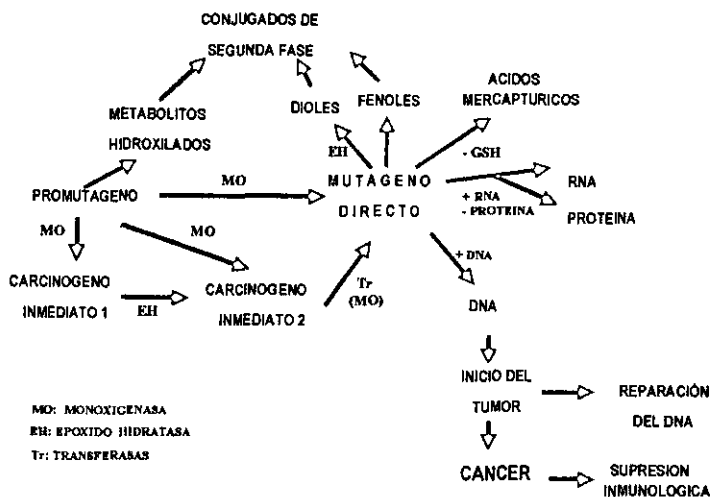


Fig.1. Se muestran las diferentes rutas que puede seguir el metabolismo de un xenobiotico, observando reacciones de oxido-reducción (Fase I) y de conjugación (Fase II). Las flechas en color verde indican las vías mediante las cuales el compuesto puede ser eliminado sin ocasionar ningún daño en el organismo. Las flechas de color rojo indican como el metabolismo participa en la activación de algún xenobiotico provocando efectos tóxicos o genotóxicos en el organismo (Foye, 1991).

TINTES

Uno de los agentes ambientales que se han asociado con el origen de diferentes tipos de cáncer son los tintes para cabello. Estos se pueden dividir en tres clases: temporales, semipermanentes y permanentes, diferenciándose entre sí por el tipo de pigmento utilizado, el modo de aplicación, el color resultante y la permanencia del mismo, siendo el más frecuentemente utilizado el permanente. Este último tiene un sistema de aplicación muy específico, el cual consiste en la oxidación de colorantes intermediarios con peróxido de hidrógeno con lo que se logra blanquear la melanina y una mejor fijación del tinte. Dentro de los intermediarios primarios se encuentran el p-fenilenediamina, la o-fenilenediamina, la p-toluendiamina y el amino fenol, los cuales al ser oxidados forman benzoquinona iminas, coloreando por sí mismas o al conjugarse con otros colorantes (acopladores). Los acopladores pueden estar basados en un anillo de benceno, en sistemas de anillos múltiples o, sistemas heterocíclicos, y requieren la sustitución de grupos en la posición 1, 3. Los acopladores mas frecuentemente utilizados son: el resorcinol (colores verde y café) o 1-naftol (colores violeta y azul) y otros compuestos "para", no oxidados, que producen pigmentos indol. Para que estas reacciones se lleven a cabo, se requiere un pH elevado, lo que se logra usualmente con amoniaco (Burnett, 1987; Sardas, *et al*, 1997).

Al realizar estudios epidemiológicos a personas que padecen algún tipo de cáncer, se ha encontrado una correlación significativa entre el empleo de tintes para cabello y el desarrollo de la enfermedad. Basándose en dichos estudios se ha planteado, que el empleo de tintes para cabello incrementa el riesgo de desarrollar cáncer como: linfoma de tipo no-Hodgkin, mielóma múltiple (Cantor, *et al*, 1988; Brown, *et al* 1992; Pearce y Bethwait, 1992; Thun, *et al*, 1994; Harrinton, *et al*, 1994; Skov y Lynge , 1994), sarcoma de Kaposi (Hardell, *et al*, 1987), de vejiga y pulmón (Skov, *et*

al, 1990), de glándula salival (Spitz, *et al*, 1990), leucemia linfocítica crónica (Cantor, *op cit*; Thun, *op cit*) de ovario (Tzonou, *et al*, 1993; Boffetta, *et al*, 1994) y efectos teratológicos (Vandemia, *et al*, 1992).

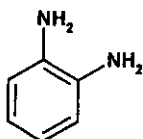
Sin embargo se han obtenido resultados contradictorios o negativos en melanoma cutáneo maligno (Osterlind, *et al*, 1988), anemia plástica (Shibata, *et al*, 1990; Grodstein, *et al*, 1994) cáncer de mama (Nasca, *et al*, 1992., Koenig, *et al*, 1991), cáncer de Willms en niños (Olshan, *et al*, 1993) y con el cáncer en bajo tracto urinario (Nomura, *et al*, 1989). Dichos resultados se han encontrado principalmente en: obreros de las empresas que elaboran el tinte, en estilistas y aún en usuarios, por lo que se plantea una controversia epidemiológica en la relación cáncer-tinte (Colditz, 1994).

Por otra parte, se han realizado análisis experimentales, tanto con tintes completos como con compuestos puros, encontrando lo siguiente: Dentro de los estudios realizados con la mezcla completa se observa que, al aplicar la prueba de Ames en diversas marcas de tintes, del 50% al 89% resultaron positivos, teniendo como característica importante, que al ser oxidados y activados metabólicamente, incrementaba su nivel de genotoxicidad (Zito, 1982; Watanabe, *et al*, 1990; Ferguson, *et al*, 1990). En un estudio realizado en China, al aplicar la prueba de Ames a 13 marcas de tintes comerciales, ninguno de éstos dio un resultado positivo (Wang *et al*, 1991; Sardas, *et al*, 1997). También se encontraron resultados negativos en pruebas con roedores, micronúcleos, ensayo cometa e intercambio de cromátidas hermanas (Wang *et al*, 1991 y Sardas *et al*, 1997) En otro estudio de teratogenicidad, se obtuvieron resultados negativos al probar la mezcla completa, (Burnett y Goldnthal, 1988).

De igual forma, al exponer a perros, ratas, ratones, conejos, monos e incluso a humanos a tintes o a alguno de sus componentes, empleando diversos protocolos, se encontró que: Los componentes del tinte son excretados por la orina y en un grado menor en las heces. El porcentaje de metabolitos encontrados fue de 0.1 a 2% de la cantidad aplicada. Aún después de 6 h de aplicación, permanecen 0.02 ppm del compuesto en sangre. De 5 a 10% permanece en la región aplicada, aún después del uso de shampoo. Se calcula que 4 a 6 mg del tinte es absorbido por el cuero cabelludo durante el proceso de aplicación. (Jouhar, 1982; Burnett, 1987; Sardas, *et al*, 1997). Se elimina 1 a 5% del compuesto cuando se aplica con base en agua y menos del 0.13% del compuesto cuando se aplica en base peróxido (Kiese, *et al*. 1968).

ORTOFENILENEDIAMINA

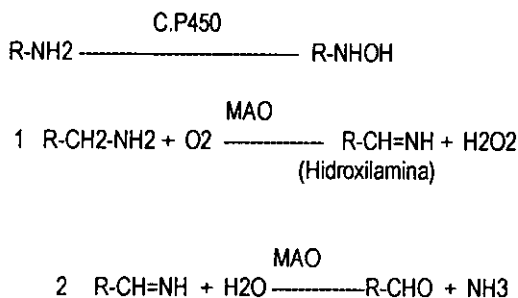
Uno de los colorantes intermedarios en el proceso de teñido y de interés en el presente trabajo, es el **orto-fenilenediamina (OFD)**, (Fig. 2), a este compuesto se le conoce también como orto-diaminobenceno, cuya formula es $C_6H_8N_2$, con un peso molecular de 108.14 en proporción de C 66.64%, H 7.46% y N 25.91%. Puede ser reducido por o-nitroanilina, con Zn y NaOH. Forma cristales amarillos, es poco soluble en agua y libremente soluble en alcohol, cloroformo y éter. La LD50 en ratas es de 600 mg/kg (Windholz, *et al*, 1995).



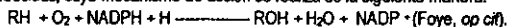
1,2-FENILENEDIAMINA

Figura 2. orto-fenilenediamina

Dadas sus características químicas, el OFD podría ser metabolizado, en la región amino por el citocromo P450¹ y/o por la Monoamino oxidasa (MAO)² formando hidroxilaminas aromáticas (Fig.3). (Foye, 1991; Avendaño, 1993; Chiapella, *et al*, 2000).



¹ El citocromo P450, es un hemoproteína férrica que toma el O₂ molecular para oxidar. Forma parte de una familia de isoenzimas capaces de ser inducidas, cuyo mecanismo de acción se realiza de la siguiente manera:



² La MAO cataliza la desaminación de aminas a aldehídos en presencia de oxígeno proveniente de H₂O, se encuentra en hígado, riñones, intestino y el tejido nervioso. Contiene flavina como grupo prostético.

La hidroxilación del anillo aromático del OFD, lo realiza la Monooxigenasa (Oxidasa de función mixta) y el citocromo P450, teniendo como intermediario al Epóxido (Oxido de arilo). Este compuesto es una molécula muy inestable que se convierten de manera espontánea a fenol, o enzimáticamente, por la epóxido hidratasa a 1,2-dihidrodiol (de configuración *trans*), que se deshidrogena convirtiéndose en 1,2-difenol. Los epóxidos, además son susceptibles a conjugación con ácido glucorónico y forman N-glucuronidos, que son ya excretados por orina y por la bilis (Foye, 1991). Además del glutatión, el epóxido activado puede interaccionar con otras macromoléculas como son proteínas y ácidos nucleicos, siendo ésta la base molecular para interpretar su posible efecto genotóxico (Fig.3) (Foye, 1991; Avendaño, 1993; Chiapella, *et al*, 2000).

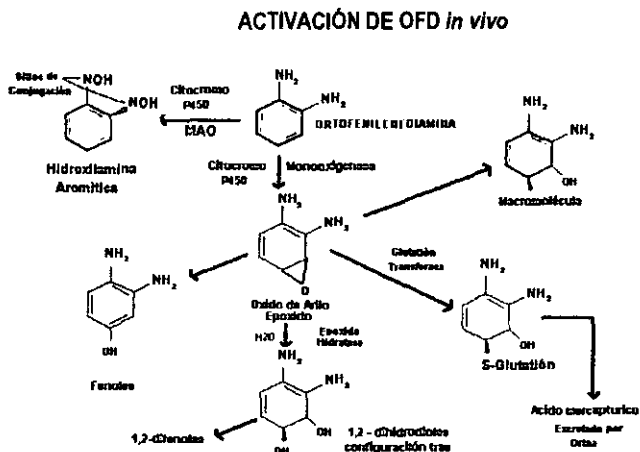


Fig.3. Esquema de las rutas metabólicas de OFD, tomado de Foye, 1991 y Avendaño, 1993. Las moléculas señaladas de color anaranjado, son las que podrían estar interactuando con el DNA.

La oxidación previa de OFD estaría acelerando la formación de hidroxilaminas aromáticas, uno de los compuestos activos que podrían interactuar con el DNA.

La mayor concentración y actividad de las enzimas que participan en el metabolismo de OFD, se localiza en el hígado, sin embargo, se ha demostrado la actividad de éstas en pulmón, riñón, intestino, nódulos linfáticos, piel, médula ósea, tejido nervioso, tracto gastrointestinal, glándulas mamarias, ovario y testículo (Centro Panamericano, 1988; Foye, 1991; Avendaño, 1993).

ANTECEDENTES

El OFD forma parte del grupo de aminas nitroaromáticas, las cuales han sido evaluadas como compuestos puros y algunos de sus derivados, reportándose como mutagénicos y cancerígenos en la mayoría de las pruebas. Particularmente los compuestos p-, m- y o-fenilenediamina, así como sus derivados con radicales metil, nitro, cloro, fluor, y diaminotolueno, se han encontrado positivos en la prueba de Ames (*Salmonella typhimurium*), incrementando su genotoxicidad, al ser oxidados y activados metabólicamente (Wild, *et al*, 1980; Watanabe, *et al*, 1989, 1990; C.I.R.E.P.S (U.S.A.), 1992; Shahin, 1994; Chung, *et al*, 1995; 1996).

Se han realizado pruebas citogenéticas, en donde se ha detectado un incremento de las alteraciones en el DNA, al exponer a linfocitos humanos, al OFD. (Cebulska, *et al*, 1998). En cuanto a los resultados de la prueba en células del ovario de hamster chino, para compuestos puros p-, m- y o-fenilenediamina, así como algunos de sus derivados, se encontró que a diferencia del radical nitro, el resto de los compuestos analizados, resultaron positivos en esta prueba (Chung, *et al*, 1995; 1996). Suter, *et al*, en 1996, realizaron una prueba *in vivo*, de cáncer en ratón, resultando positivo el 4-cloro-o-fenilenediamina, para cáncer de vejiga, y el 2,4-diamino tolueno para hígado y glándulas mamarias. Por otra parte, al realizar la prueba de SMART en el ojo, a compuestos derivados de o- y p-fenilenediamina, se encontró que el más genotóxico es el 4,4-oxidianilina. Por medio de este mismo trabajo, se determinó que el o- y el m-fenilenediamina, tiene mayor efecto mutagénico que el p-fenilenediamina. (Rodríguez-Arnaiz y Hernández, 1994). Batiste-Alentom, *et al*, 1995, utilizando tres ensayos de la prueba SMART, encontraron que el PFD a 10mM presentaba efecto mutagénico.

Cabe mencionar que, según el grupo radical en el C5 ó C6, es la genotoxicidad que presentan. Los radicales cloro, nitro, metoxi y fluor, son mutagénicos aún sin ser activados en la prueba de Ames. Se ha determinado que los compuestos bicíclicos son más genotóxicos. (Rodríguez-Arnaiz y Hernández, *op. cit.*; Shahin, *et al*; Chung, *et al*, *op. cit.*).

Al realizar una evaluación de teratogenicidad, se encontró que el 2-Nitro-p-fenilenediamina, incrementa significativamente el porcentaje de las malformaciones en fetos en una dosis de 160 mg/kg/día y superiores. Para el caso de la 4-Nitro-o-fenilenedamina, se encontró efecto teratogénico a una concentración de 256 mg/kg/día, resultando ser el corazón, el órgano que más alteraciones presenta. El 2,5-Toluenediamina sulfato no resultó teratogénico (Marks, *et al*, 1981). Al realizar una prueba de teratogenicidad a un derivado de p-fenilenediamina, se obtuvo un resultado negativo, tanto en las madres como en los fetos (Burnett, *et al*, 1986).

Se han realizado trabajos en sistemas vegetales, particularmente en *Tradescantia*, donde han encontrado que el o- m- y p-fenilenediamina, son promutágenos y muestran diferente potencia mutagénica, siendo ésta de 5.6, 1.43 y 0.46 respectivamente (Gichner, *et al*, 1994). Así mismo, en sistemas vegetales como: *Persea americana*, *Zea mays* y *Tradescantia*, el OFD ya ha sido empleado como testigo positivo para determinar una respuesta de estos sistemas a promutágenos (Gichner y Velerminsky, 1999).

Otros compuestos empleados en los tintes para cabello, similares al OFD son el HC Blue 1, 2 y HC Red 3, han sido valorados con la prueba de Ames dando resultados positivos (Burnett, 1987) sin embargo solo el HC Blue 1 resulta cancerígeno en ratas. En otra prueba con hepatocitos realizada a este último compuesto se le determinó como un potente inductor de aberraciones cromosómicas, por otra parte se observó que induce significativamente la formación de micronúcleos en médula ósea de ratón. Sin embargo, en un ensayo de reversión con *Salmonella typhimorium*/ *E. coli* y un ensayo de mutaciones progresivas de linfoma de ratón los resultados muestran que HC Blue 1 no es mutagénico en la prueba de *Salmonella* y lo es débilmente en ratón cuando está activado con el sistema microsomal (Overly, 1990). En cuanto a las aminas nitroaromáticas se reportan con efecto de toxicidad sistémica, observando claro efecto en riñón y en otros órganos (Borquia, 1988; Lifshits, *et al*, 1993).

A pesar de todos los resultados positivos, aún existen reportes que muestran un efecto negativo del OFD y sus derivados. En cuanto a la toxicidad en células de mamíferos, en micronúcleos en médula ósea y linfoma de ratón, Kerckaert, *et al*, 1998 obtuvieron resultados negativos en estas pruebas. En ensayos a largo plazo en conejos y roedores, Burnett *et al*, 1977 y Burnett y Goldenthal, 1988, encontraron resultados negativos para dichos ensayos al analizar aminas nitroaromáticas. Por lo anterior es necesario realizar más estudios para definir la acción mutagénica positiva o negativa de estas aminas aromáticas.

BIOENSAYOS A CORTO PLAZO

Los estudios epidemiológicos han demostrado ser muy eficientes para determinar la relación de enfermedades con sus probables causas, permitiendo tener en el ámbito clínico una guía para el diagnóstico y prevención de las mismas. Sin embargo, no son totalmente confiables, ya que no se puede determinar la dosis y el periodo aproximado de exposición al factor de riesgo, ni controlar las actividades y hábitos de cada individuo, haciendo difícil centrar en un solo aspecto el origen de la enfermedad. Cabe mencionar, que en muchos casos, es notoria la diferencia temporal entre el momento de exposición al factor de riesgo y la manifestación clínica, lo que impide en un momento dado, relacionar a la enfermedad de interés con dicho factor.

Ante tales circunstancias, se ha tenido la necesidad de diseñar modelos experimentales para el estudio de posibles agentes mutagénicos, directos o indirectos, dentro de estos se pueden mencionar los Bioensayos a Corto Plazo (BCP). En dichas pruebas se expone (*in vivo* o *in vitro*) al organismo, cultivo de células o bacteriófagos, en forma controlada, al agente con efecto genotóxico sospechoso. Para obtener el mayor beneficio de estas pruebas se requiere interpretar de manera cuidadosa los resultados, tomando en cuenta las diferencias de susceptibilidad entre las especies y las concentraciones aplicadas (Vogel, 1991).

Las pruebas a corto plazo deben de cubrir los siguientes requisitos (Vogel, 1991):

- a) La presencia de un sistema de activación (*in vitro* o *in vivo*) para la detección de promutágenos.
- b) El uso de un sistema indicador sensible con el cual se pueda medir el daño genético inducido por el agente genotóxico.
- c) Un efecto genético bien definido (Daños primarios o secundarios al DNA).

Drosophila melanogaster

Ha sido uno de los modelos experimentales utilizados en BCP, dadas sus características: Es un organismo eucariota, pluricelular, presenta genes implicados en el metabolismo de xenobióticos y en la reparación de daños al ADN, homólogos al de los humanos (Russell, 1998). Se conoce todo su genoma. No se requieren grandes inversiones para su mantenimiento y gracias a que se obtiene un gran número de organismos por generación, se puede realizar un análisis estadístico confiable. (Fig.4)

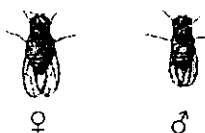


Fig.4 ***Drosophila melanogaster***

Tiene un ciclo de vida corto que va de 10 a 12 días a 25°C, con estadios de desarrollo bien definidos, esta característica permite analizar dosis crónicas, agudas y fraccionadas de manera controlada. Su ciclo de vida inicia con la ovoposición, a las 24 horas eclosionan las larvas que pasan por tres estadios, antes de pasar a prepupa, pupa y adulto (Figura 5). Después de que emergen las moscas, los machos son fértiles, en aproximadamente 6 a 8 horas, mientras que las hembras tardan de 10-12 horas. Durante la fase larvaria la ingestión de alimento es continua, llegando a consumir de tres a cinco veces su peso, incrementándolo de 0.05 a 2.0 mg (Mitchel y Combes, 1984).

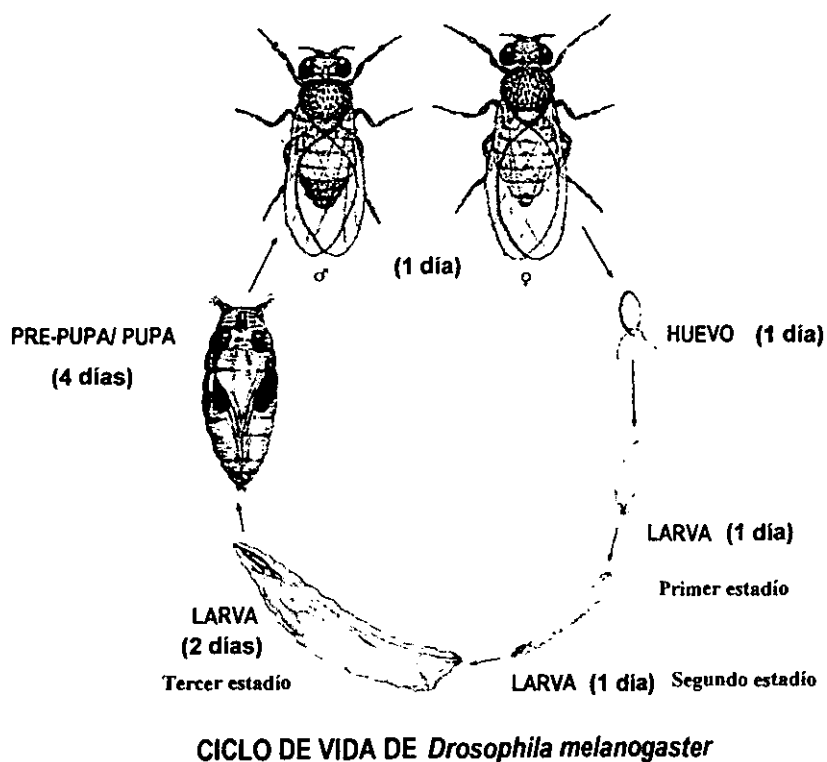


Figura 5. Se muestran los estadios del ciclo de *D. melanogaster*, así como la duración de cada uno de ellos.

Las larvas de *D. melanogaster* tiene dos linajes celulares, el larvario y el imagal (discos imagales). El primero está implicado exclusivamente con el desarrollo de la larva y su fisiología, mientras que los discos imagales, son bolsas epiteliales que permanecen indiferenciadas durante el estadio embrionario. En la metamorfosis los discos se activan y diferencian para formar las estructuras particulares del cuerpo del adulto, como antenas, ojo, halterio, patas, genitales externos, etc. (Lawrence, 1992) (Figura 6)

DISTRIBUCIÓN DE LOS DISCOS IMAGALES EN LA LARVA

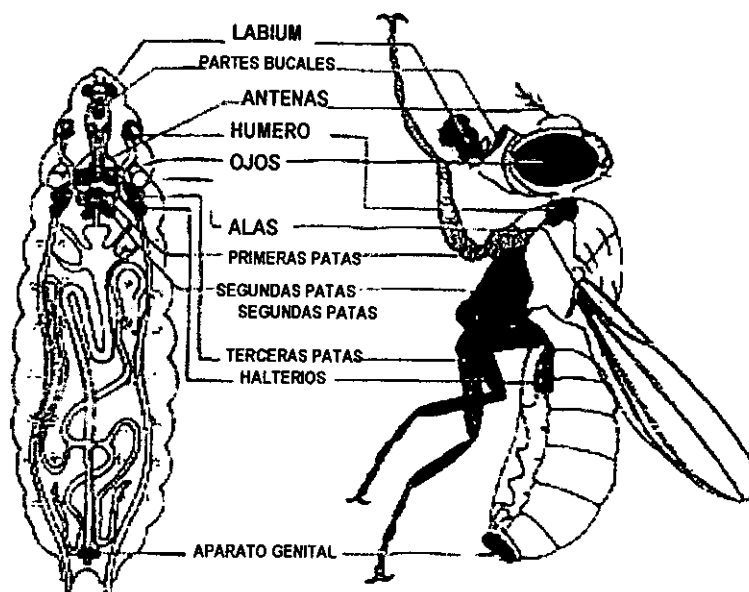


Figura 6. Se observa cada uno de los discos imagales presentes en las larvas de *D. melanogaster*, así como las estructuras a las que dará origen (Lawrence, 1992).

Dentro de los bioensayos a corto plazo, los discos imagales constituyen un excelente material de estudio. Cada uno de ellos, aparece como un primordio de 20 a 50 células desde el primer estadio larvario, el número de células por cada disco se incrementa por mitosis hasta el final de la fase larvaria, en la que llega a contener miles de células por disco. De tal manera que, si ocurriera un daño genético en una célula de los discos imagales, éste se expresaría en el adulto, como un clon de células mutantes en el tejido correspondiente al disco (Mitchel y Combes, 1984).

PRUEBA DE GENOTOXICIDAD SMART

Uno de los bioensayos a corto plazo que ha dado buenos resultados es la Prueba de Mutación y Recombinación Somática (SMART), la cual detecta mutaciones puntuales, aneuploidías y recombinación mitótica provocadas por la exposición a diferentes dosis de algún agente químico o físico, utilizando como modelo experimental a *Drosophila melanogaster* (Guzmán-Rincón y Graf, 1995).

La prueba SMART, utiliza dos diferentes sistemas fenotípicos: mutaciones en las células de los ojos o en los tricomas de las alas. Ambos sistemas tienen como fundamento, la pérdida de heterocigosidad de genes marcadores en las células de los discos imagales de las larvas, que se expresan como clones o manchas en las alas o en los ojos de los organismos adultos. Al exponer a las larvas a un agente sospechoso, si hay daño en el material genético, éste se puede determinar mediante métodos estadísticos, comparando el tipo y frecuencia de manchas en los tejidos, correspondientes con la obtenida en organismos no expuestos. (Guzmán-Rincón y Graf, op. cit.)

SMART en el ALA

Al utilizar el fenotipo del ala, el ensayo tiene la posibilidad de exponer al tratamiento, a un gran número de células de los discos imagales de las larvas, las cuales, posteriormente darán origen a un número mayor de células en el estado adulto, aproximadamente 25,000 células por ala. Las alas de los adultos están formadas por dos capas celulares, una ventral y otra dorsal de manera que los eventos registrados en una capa son independientes de la otra. Al diferenciarse cada célula da origen a un tricoma o pelo, que se forma por la acumulación de fibras de actina en la célula. El tricoma crece durante la metamorfosis y posteriormente, la célula que le dio origen muere quedando la presencia del tricoma en la superficie del ala. De ésta manera puede establecerse la relación directa entre el número de tricomas o pelos en los distintos sectores del ala y el número de células que la forman. Todo lo anterior permite obtener resultados en una generación (Demerec, 1965; García y Merriam, 1971; García y Dapena, 1974; Graf, *et al*, 1984).

En la prueba SMART en el ala, se utilizan tres líneas, *multiple wing hair (mwh/mwh)*, *flare (fl³/TMA3, Bd(S))* y *oregon (ORR(1); (ORR(2); fl³/TMA3, Bd(S))* con los siguientes marcadores:

· *mwh* (*multiple wing hairs*): Mutación recesiva localizada en el brazo derecho del cromosoma 3 (3-0.3). Su expresión fenotípica se observa como un cambio en el número de tricomas por célula (2-5), mientras que en el fenotipo silvestre a cada célula le corresponde un solo tricoma.

· *flr³* (*flare*): Es una mutación recesiva que se expresa como tricomas mal formados y cortos, en forma de flama o roseta de maíz. Está localizada en el brazo derecho del cromosoma 3 pero en una posición más próxima a la del anterior (3-38.8) (Ramos, 1993). Esta mutación en homocigosis es letal, sin embargo, las células individuales homocigotas en los discos imagales de las alas, son viables y pueden producir clones mutantes en las células del ala del adulto (Graf, *et al*, 1996).

· *Serratia* (*Bd(S)*): Para reconocer fenotípicamente a la línea *flare*, se utiliza este marcador dominante, que se manifiesta como muescas en los bordes de las alas. Este marcador en condiciones de homocigosis también es letal. Se localiza en el cromosoma 3 (3-92.5) (Ramos, 1993).

· *Inversión TM3*: Como los marcadores *flr³* y (*Bd(S)*) son letales en homocigosis, la línea *flare* presenta un cromosoma balanceador con inversiones múltiples (TM3), que evita la recombinación en meiosis y permite mantener la línea. De esta forma se mantienen los marcadores letales en heterocigosis (Graf, *et al*, 1996).

· *Oregon Or*: Este marcador confiere a la línea Oregon una resistencia a DDT y una sobre expresión de manera constitutiva de algunos genes de citocromo P450. La construcción de la línea ORR(1); ORR(2); *flr³* / TM3, *Bd(S)*, ha permitido valorar *in vitro* el efecto del metabolismo xenobiótico regulado por la familia de citocromo P450, que producen la inactivación o activación de

carcinógenos, promutágenos y sus metabolitos, sobre los marcadores *mwh* y *fir*. Esta línea fue obtenida al someter a oregon silvestre a selección artificial con DDT (Dapkus y Merrel, 1977 citado en Graf y Schaik, 1992 y Delgado-Rodríguez, *et al*, 1995). Con el objeto de aumentar la sensibilidad de la prueba SMART para el ala, Frölich y Würgler en 1989, reemplazaron el cromosoma 1 y 2 de la línea *fir*³ / TM3, Bd(S) con el de las líneas resistentes al DDT y construyeron la línea ORR (1); ORR(2); *fir*³ / TM3, Bd(S). El gen con mayor resistencia y probablemente una función reguladora está en el cromosoma 2 (*Rst* (2) DDT) localizado en la región 43E del cromosoma 2 (2-56.2) que regula los genes estructurales del citocromo P450 localizados en el cromosoma 2 (42D, 43A (*Cyp6a2*), 44A, 45C y 51C (*Cyp6a8*, *Cyp6a9*)), en el cromosoma 1 y en el 3, algunos de los cuales son responsables del metabolismo de xenobióticos.

Es importante mencionar que el utilizar marcadores localizados en el mismo cromosoma, permiten discernir fenómenos de recombinación en la región delimitada por el marcador *fir*³ y el centrómero o en la región entre los dos marcadores. Como resultado de eventos de recombinación puede recobrase manchas sencillas y gemelas, este último evento es resultado de recombinación en el intervalo próximo al centrómero que es acotado por el marcador *fir*³, mientras que las manchas sencillas *fir*³ o *mwh* indican recombinación entre *fir*³ y *mwh*. Por otra parte pueden obtenerse manchas sencillas *fir*³ o *mwh* por eventos como mutación puntual, pérdida parcial o total del cromosoma 3 o por una no-disyunción, ver figura 7. (Graf, *et al*, 1984).

EVENTOS QUE CONDUCE A LA PÉRDIDA DE HETEROCIGOSIDAD

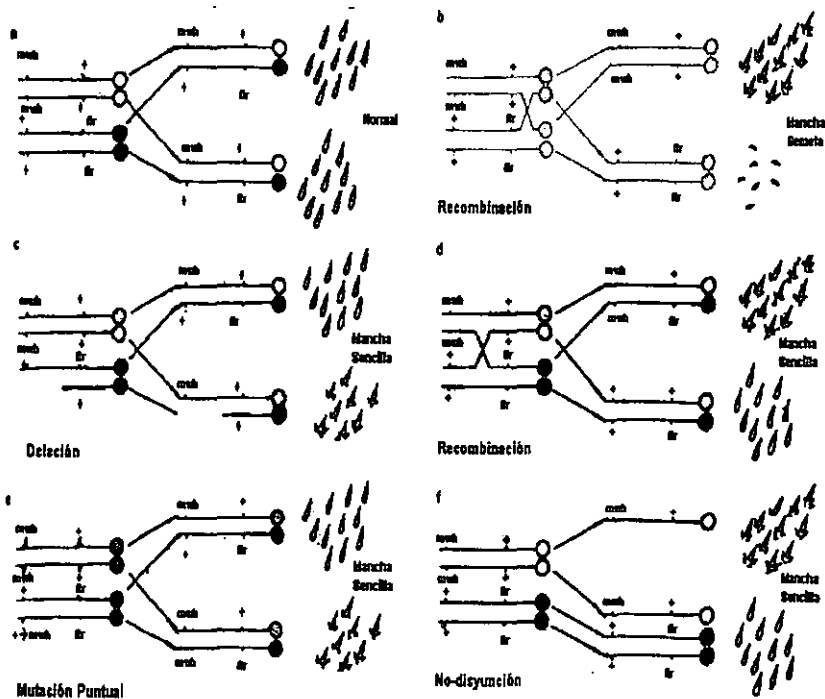
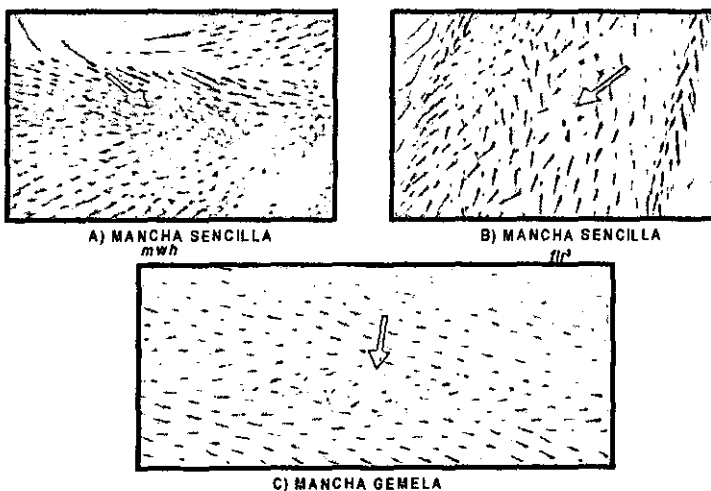


Figura 7. Se muestran los fenotipos observados en los tricomas de las alas originados por la pérdida de heterocigosidad en los marcadores genéticos empleados en la prueba SMART

Las cruza empleadas para la prueba del fenotipo en ala, son la **estándar E** (hembra virgen *fir³/TM3, Bd(S)* X macho *mwh/mwh*) y **bioactivación elevada BE** (hembra virgen *ORR(1); ORR(2); fir³/TM3, Bd(S)* X macho *mwh/mwh*), esta ultima crusa permite detectar compuestos promutágenos. Cabe mencionar que para esta prueba no se emplea la crusa recíproca por que presenta desventajas como: un patrón irregular de manchas en las alas que dificulta la clasificación, resultados inconsistentes y se obtiene menor número de individuos por generación (Graf y Schaik, op. cit.).

Las larvas productos de estas cruizas tienen un fenotipo *mwh fir³⁺ / mwh⁺ fir³* o *mwh fir³⁺ / TM3, Bd(S)*, en teoría en proporción 1:1, ambas larvas son indistinguibles pero al recuperar adultos, el primer genotipo genera moscas con alas fenotipo silvestre y el segundo alas serratia. Los genotipos obtenidos proporcionan diferente información, el que presenta fenotipo silvestre, permite observar manchas sencillas *mwh* (Fig.8 A), sencillas *flare* (Fig.8 B) y gemelas (Fig.8 C). Sin embargo, los organismos que presentan el fenotipo serratia, solo se podrán observar manchas sencillas tipo *mwh* originadas por mutación, ya que la presencia del balanceador TM3, no permite la recombinación. (Graf y Schaik, op. cit.; Delgado-Rodriguez, *et al*,1994;Graf y Würigler, 1996).

Fig.8 . FENOTIPO DE LAS MANCHAS ANALIZADAS



Una vez que se obtienen las cruasas y las larvas que derivan de ellas, estas últimas son expuestas por diferentes vías al compuesto problema. Cuando los organismos tratados emergen de la pupa, se montan las alas en preparaciones permanentes y se observan al microscopio para determinar el tipo, tamaño y frecuencia de las manchas, comparándose con las de los organismos expuestos al control negativo (Delegado, *et al*, 1994).

Se contabilizan las manchas por tipo y tamaño en cada ala y por cada individuo, éstas se analizan por medio del programa estadístico (SMART), el cual está basado en una ji-cuadrada para proporciones. Esta prueba permite comparar las proporciones de manchas por ala entre dos muestras. El efecto genotóxico se denomina en esta prueba como: positivo, negativo, débil positivo o no concluyente (Delegado y Graf, *op. cit.*). El análisis se realiza por individuo ya que es posible encontrar algunos organismos especialmente sensibles en los cuales el efecto se expresa de forma marcada, mientras que otros no muestran daño alguno.

La prueba de SMART ha mostrado grandes ventajas, como lo son, su alta sensibilidad, el modelo tan accesible que utiliza y el costo de inversión que representa. Esta metodología tiene como respaldo la detección de más de 400 compuestos, incluyendo tanto mezclas como compuestos aislados, es muy fácil de aplicar y de gran utilidad por la enorme demanda de este tipo de estudios a diversos compuesto químicos que se introducen periódicamente a la vida cotidiana (Vogel, *et al*, 1999).

JUSTIFICACION

Los reportes encontrados sobre la evaluación de las aminas aromáticas incluidas en las mezclas de los tintes para cabellos han sido desarrollados principalmente en Estados Unidos. Dado que contamos con una carga genética diferente y que nos exponemos a condiciones de vida distintas, es importante realizar investigación tanto epidemiológica como experimental sobre éste tema en México.

Es de interés el estudio de OFD, por que si bien, actualmente este compuesto ya no es empleado como ingrediente en algunas marcas de los tintes comerciales, además de que, fue hasta hace poco que se retiró del mercado, y un gran número de personas han estado expuestas a ésta amina y de ahí el interés de conocer más sobre su efecto genotóxico.

Se plantea la posibilidad de contribuir con información acerca del efecto genotóxico de OFD empleando para ello la prueba de SMART en el fenotipo de alas.

HIPÓTESIS

1. - De acuerdo con los antecedentes, el ortofenilenediamina es un promutágeno, por lo que se encontrará mayor efecto genotóxico en la cruce BE.

2. - Si, de acuerdo con los antecedentes el producto oxidado de ortofenilenediamina es un mutágeno directo, se encontraran resultados positivos para este compuesto oxidado en la cruce E.

Para comprobar las hipótesis se plantea el siguiente objetivo general:

OBJETIVO

Evaluar el efecto genotóxico de orto-fenilenediamina oxidado y sin oxidar a concentraciones de 0.6, 1 y 2 μM , en *Drosophila melanogaster* mediante la prueba SMART en ala en cruces E y BE.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para el cumplimiento del objetivo planteado se realizó la siguiente metodología.

Se colectaron hembras vírgenes de las líneas *fir³/TM3 Bd(S)* y *ORR(1); ORR(2); fir³/TM3, Bd(S)*.* Las hembras fueron aisladas a las \pm 4 horas después de emerger de la pupa, y se verificó su virginidad manteniéndolas aisladas durante tres días.

* Las líneas fueron donadas por el Dr.Ulrich Graf, del Institute of Toxicology, Swiss Federal Institute of Technology (ETH) and University of Zurich.

HIPÓTESIS

1. - De acuerdo con los antecedentes, el ortofenilenediamina es un promutágeno, por lo que se encontrará mayor efecto genotóxico en la cruce BE.

2. - Si, de acuerdo con los antecedentes el producto oxidado de ortofenilenediamina es un mutágeno directo, se encontraran resultados positivos para este compuesto oxidado en la cruce E.

Para comprobar las hipótesis se plantea el siguiente objetivo general:

OBJETIVO

Evaluar el efecto genotóxico de orto-fenilenediamina oxidado y sin oxidar a concentraciones de 0.6, 1 y 2 μM , en *Drosophila melanogaster* mediante la prueba SMART en ala en cruces E y BE.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para el cumplimiento del objetivo planteado se realizó la siguiente metodología.

Se colectaron hembras vírgenes de las líneas *fir³/TM3 Bd(S)* y *ORR(1); ORR(2); fir³/TM3, Bd(S)*.^{*} Las hembras fueron aisladas a las ± 4 horas después de emerger de la pupa, y se verificó su virginidad manteniéndolas aisladas durante tres días.

^{*} Las líneas fueron donadas por el Dr. Ulrich Graf, del Institute of Toxicology, Swiss Federal Institute of Technology (ETH) and University of Zurich.

HIPÓTESIS

1. - De acuerdo con los antecedentes, el ortofenilenediamina es un promutágeno, por lo que se encontrará mayor efecto genotóxico en la cruce BE.

2. - Si, de acuerdo con los antecedentes el producto oxidado de ortofenilenediamina es un mutágeno directo, se encontraran resultados positivos para este compuesto oxidado en la cruce E.

Para comprobar las hipótesis se plantea el siguiente objetivo general:

OBJETIVO

Evaluar el efecto genotóxico de orto-fenilenediamina oxidado y sin oxidar a concentraciones de 0.6, 1 y 2 μM , en *Drosophila melanogaster* mediante la prueba SMART en ala en cruces E y BE.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para el cumplimiento del objetivo planteado se realizó la siguiente metodología.

Se colectaron hembras vírgenes de las líneas *fir³/TM3 Bd(S)* y *ORR(1); ORR(2); fir³/TM3, Bd(S)*.* Las hembras fueron aisladas a las ± 4 horas después de emerger de la pupa, y se verificó su virginidad manteniéndolas aisladas durante tres días.

* Las líneas fueron donadas por el Dr. Ulrich Graf, del Institute of Toxicology, Swiss Federal Institute of Technology (ETH) and University of Zurich.

Posteriormente se realizaron las cruzas **Estándar E** *fir³TM3 Bd(S)* hembras vírgenes X *mwh/mwh* machos y de **Bioactivación Elevada BE** ORR(1); ORR(2); *fir³TM3, Bd(S)* hembras X *mwh/mwh* machos. Tres días después, se procedió a colectar huevos durante ocho horas (en un medio de levadura), provenientes de cada cruce, lo anterior se realizó para obtener larvas del segundo estadio (72 ± 4 hrs). Este estadio larvario es óptimo para la prueba, ya que es en éste donde se da un nivel elevado proliferación celular, además de que es mayor la cantidad de alimento que consumen y son lo suficientemente maduros como para soportar el tratamiento. (Graf, *et al*, 1984).

Una vez que se obtuvieron las larvas de 72 ± 4 hrs, se colocaron en medio instantáneo "Carolina Biological Supply Company", en donde se expusieron a un tratamiento crónico vía oral de 48 hrs a las concentraciones de 0.6 μ M, 1 μ M 2 μ M de OFD donado por el Dr. Ulrich Graf (Fluka Biochemica, CAS: 95-54-5, Reg. 2024306, Pureza, 99%). Estas concentraciones, se emplearon tanto oxidadas 1:1 con peróxido de hidrógeno al 6%, como sin oxidar, y fueron determinadas mediante ensayos previos, basándose en la LD50 determinada para ratas, 600 mg/kg. (Windholz, *et al*, op-cit.).

Se emplearon las concentraciones oxidadas 1: 1 con peróxido de hidrógeno al 6%, porque así es como se aplica en los tintes permanentes, y porque se ha planteado que el producto de la oxidación es el que presenta el efecto genotóxico (Burnett, 1987).

Como testigo negativo se utilizó el agua desionizada y como testigo positivo, el uretano a 20 mM donado por el Dr. Ulrich Graf (Fluka, No. Cat. 94300, Reg. No. 51-79-6, pureza 99%) para

verificar marcadores. Cabe mencionar que no se utilizó el peróxido de hidrógeno como testigo, porque es muy tóxico y principalmente porque el interés de este trabajo es analizar el efecto del producto oxidado de OFD y no el peróxido como tal.

Cada tratamiento se realizó en condiciones similares y las larvas se desarrollaron en un ambiente controlado. Las concentraciones se probaron oxidadas y sin oxidar, en ambas cruzas, con tres repeticiones por tratamiento, en tres experimentos independientes.

Una vez que los organismos tratados emergieron de la pupa y tenían bien extendidas las alas, éstas se fijaron en alcohol al 70%. Posteriormente se realizaron preparaciones permanentes, desprendiéndolas del organismo y colocándolas en portaobjetos, con solución Faure's (30g goma arábica, 20 ml de glicerol, 50g de hidrato de cloral y 50 ml de agua). Se colocaron protegidas del polvo, en una plancha a 40°C durante 24 h; después de éste tiempo se les añadió 2 gotas de solución Faure's y se cubrieron con un cubreobjetos del No.1 colocándoles encima 3 pesas de 83g cada una, finalmente las preparaciones permanecieron en la plancha por 24 h.

Se analizaron las alas (tanto la superficie dorsal como la ventral) a "doble ciego" para evitar prejuicios. Se empleó un microscopio óptico a 400X aumentos para determinar la frecuencia, tamaño y tipo de mancha. Se registró en formatos especiales el tipo y tamaño de las manchas encontradas en cada región del ala, A, B, C etc., según la división natural de las venas. Fig.9.

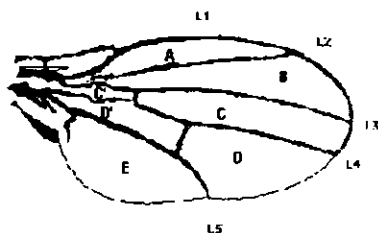


Figura 9. Se muestra la delimitación de las zonas de lectura del ala de *D. melanogaster* para la prueba SMART. Los números indican las venas que dividen de manera natural el ala y las letras A, B, C, C', D, D', y E corresponden a regiones que fueron determinadas arbitrariamente para el registro de las manchas.

Se registraron como *mwh* aquellos tricomas constituidos por tres o más pelos. Se consideró que dos manchas son independientes si están separadas entre sí por 3 hileras de células normales. Se analizaron en la mayoría de los casos, más de 110 alas por tratamiento, de acuerdo con lo sugerido por Frei y Würigler, 1995.

Los datos se analizaron en el programa estadístico para SMART PC-versión 2.1, desarrollado por Frei y Würigler en 1989, el cual se basa en la prueba no paramétrica ji-cuadrada para proporciones, con un grado de libertad de 0.05. En el análisis estadístico las manchas pequeñas (de 1 a 2 células), se consideran de manera independiente a las manchas grandes (3 o más células), así como de las gemelas.

De acuerdo con Frei y Würigler, 1995, para determinar el resultado, se emplearon para la prueba las siguientes hipótesis estadísticas: nula (H_0), ésta asume que el tratamiento experimental

no incrementa la frecuencia de la expresión de los marcadores ocurridos de manera espontánea en el control; la hipótesis alterna H_a , asume que *a priori* un tratamiento determinado incrementa la frecuencia espontánea por un cierto múltiplo (p) de la frecuencia obtenida en el control. Esta constante ρ indica cuántas veces debe incrementarse el número de eventos, con respecto al testigo para considerar una respuesta positiva.

Para asignar resultados positivos, se utiliza de manera empírica un factor de multiplicación (se denomina m en lugar de p), Se emplea $m=2$ para las manchas totales y pequeñas, utilizando para las manchas grandes y gemelas una $m=5$, según lo reportado por Frei y Würigler, 1995.

El diagnóstico estadístico generado por éste programa puede ser cualquiera de los siguientes:

1. - Que se acepte la hipótesis nula (H_0) y se rechace la hipótesis alterna (H_a): **Negativo**.
2. - Que se acepte H_a y se rechace H_0 : **Positivo**.
3. - Que se acepte H_a cuando H_0 es verdadera (Es decir, que el resultado quede muy cerca del área de rechazo): **Débil positivo**
4. - Que no se rechace H_0 o H_a cuando sea falsa, o que no se acepte H_0 o H_a cuando sea verdadera (Este resultado se presenta cuando el tamaño de muestra es muy pequeño): **No concluyente**

Para corroborar los resultados obtenidos en la prueba SMART, y para discernir los resultados débiles positivos o no concluyente que se pudieran obtener en los tratamientos con la misma, se aplicó la prueba no paramétrica de U de Mann-Whitney con modificación para una cola (Frei y Würigler, 1995). En esta prueba, se comparan los datos contra la hipótesis nula, los resultados obtenidos son significativos o no significativos. La prueba de U analiza los datos sin la exigencia de una distribución normal y considera la variabilidad individual. Se empleó para este análisis el programa estadístico STAT graphics versión 6.0.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Dado que los resultados obtenidos en los tres experimentos independientes fueron similares en SMART, éstos se unieron para el análisis. Debido a la toxicidad de o-fenilenediamina, se obtuvieron diferentes número de organismos por tratamiento, logrando analizar en la mayoría de los casos alrededor de 120 alas por cada uno, según lo recomendado de Frei y Würigler, 1995. Particularmente, en la concentración de 2 μM de OFD oxidado en la cruza E, no se recuperaron organismos adultos para aplicar la prueba por lo que para ese bloque de experimentos solo se analizaron las dos primeras concentraciones.

Al analizar las frecuencias y tipos de manchas obtenidas en cada tratamiento se encontró lo siguiente:

La frecuencia de manchas totales por individuo (FMTI) obtenidas para el testigo negativo (H_2O), se encontró dentro del rango esperado, siendo para la cruza E de 0.92 y para la cruza BE 0.77. Lo anterior concuerda con lo reportado por Ribeiro *et al.*, en 1997, quienes encuentran una frecuencia de mutación espontanea de 1.1 para E y 0.9 para BE. (Tablas 1.1, 1.2).

En el caso del testigo positivo, Uretano 20 mM, las FMTI fueron, para estándar 2.8 y para BE 13.65, las frecuencias obtenidas en ésta última cruza fueron 4.87 veces más que en E. Esta diferencia coincide con lo reportado por Frölich y Würigler en 1990, ya que el uretano es un promutágeno, y la expresión constitutiva del citocromo P450, característica de BE, permite observar más claramente la genotoxicidad de este tipo de compuesto.

OFD SIN OXIDAR.

Al realizar el análisis con la prueba SMART, en la cruza **E**, no se encontró efecto genotóxico al exponer a OFD sin oxidar en ninguna de las concentraciones empleadas, solo se encontraron resultados no concluyentes para manchas gemelas en las tres concentraciones (Tabla 1.1 a-1 y Gráfica 1). El resultado anterior se podría explicar por las siguientes posibilidades: Las concentraciones empleadas fueron muy bajas para producir efecto, o bien, esta amina aromática sin oxidar no se comporta como mutágeno directo.

Los resultados obtenidos para este bloque de datos fueron analizados mediante la prueba de U de Mann-Whitney, encontrando resultados negativos para todas las concentraciones y tipo de manchas, por lo que se puede establecer que el OFD sin oxidar en las concentraciones utilizadas para la cruza **E** no tiene efecto genotóxico. Estos resultados estarían confirmando que el OFD sin oxidar no es mutágeno directo, lo que concuerda con lo reportado por Watanabe *et al*, (1989) y Zito, (1982), quienes al realizar ensayos con sistemas bacterianos, determinaron que la oxidación es necesaria para observar efecto mutagénico de OFD. (Tabla 1.1 a-2)

Por otra parte, se encontró que, al exponer a la cruza **BE** a las tres concentraciones de OFD sin oxidar, sólo las concentraciones de 0.6 y 1 μM presentaron un efecto genotóxico, exclusivamente para las manchas pequeñas originadas por mutaciones puntuales, no-disyunción o recombinación en mitosis según la figura 7. Este compuesto podría haber sido activado por el citocromo P450, por lo que actuaría tardíamente en la pupa, produciendo un mayor número de manchas pequeñas. Sin embargo, con la concentración 2 μM , el OFD sin oxidar no mostró efecto (Tabla 1.2 b-1) y Gráfica. 2).

Una hipótesis que se plantea para explicar éste último resultado, es que a $2\mu\text{M}$ se indujeran proteínas de estrés que ayudarían a la detoxificación, por lo que los organismos obtenidos no mostrarían daño a nivel genotóxico. Sin embargo, dadas las características de éste trabajo ésta hipótesis no puede ser probada, por lo que se requeriría de otro tipo de metodología para ello.

Los resultados anteriores fueron corroborados mediante la prueba de U de Mann-Whitney con un 95% de confianza, lo que indica que: el OFD sin oxidar se comporta aparentemente como promutágeno, ya que a diferencia de los resultados encontrados en la cruce E, en la cruce BE ya se presenta efecto genotóxico para las manchas pequeñas con 0.6 y $1\mu\text{M}$ de OFD aún sin oxidar. Dado el origen de este tipo de manchas, el OFD podría ser un compuesto que ocasione daño al DNA causando mutaciones puntuales, no-disyunción o recombinación en mitosis (Tabla 1.2 b-2).

Los resultados obtenidos en la cruce BE concuerdan con lo descrito por Watanabe, *et al.*, 1989; Zito, 1982; Rodríguez-Amaiz y Hernández 1994; Shahin, 1994; Chung, *et al.*, 1996, quienes reportan a OFD como un promutágeno, por lo que se requiere la activación metabólica para observar su efecto.

TABLA 1. 1 RESUMEN DE RESULTADOS OBTENIDOS EN LA PRUEBA EN EL ALA DE *Drosophila* (SMART Y U DE MANN-WHITNEY)

Cruza: hembras *flr3/TM3,Bd(S)* x machos *mwh/mwh*. (E)
Orto-fenilenediamina

		Frecuencia de manchas o clones por alas (Número de manchas por ala) Diagnóstico estadístico*			
Compuesto [] en μ M	No.de Moscas	Manchas sencillas (1-2 células)	Manchas grandes (>2 células)	Manchas gemelas	Manchas totales
		M = 2.00	m = 5.00	m = 5.00	M = 2.00

a-1) Prueba SMART

Testigo agua 0.0	118	0.78 (92)	0.12 (14)	0.02 (2)	0.92 (108)
0.6	60	0.77 (46)-	0.10 (6)-	0.05 (3)i	0.92 (55)-
1.0	56	0.75 (42)-	0.09 (5)-	0.02 (1)i	0.86 (48)-
2.0	58	0.83 (48)-	0.07 (4)-	0.0 (0)i	0.90 (52)-

a-2) Prueba de U de Mann-Whitney

0.6	60	0.77 (46)-	0.10 (6)-	0.05 (3)-	0.92 (55)-
1.0	56	0.75 (42)-	0.09 (5)-	0.02 (1)-	0.86 (48)-
2.0	58	0.83 (48)-	0.07 (4)-	0.0 (0)-	0.90 (52)-

Para SMART: Diagnóstico estadístico de acuerdo a Frei y Würgler, 1988: donde + = positivo; - = negativo; w = débil positivo; i = no concluyente. m = factor de multiplicación.

Nivel de probabilidad: $\alpha = \beta = 0.05$. Prueba estadística de una cola.

Para la prueba de U: - = negativo con 95% de confianza (Frei y Würgler, 1995)

TABLA 1. 2 RESUMEN DE RESULTADOS OBTENIDOS EN LA PRUEBA EN EL ALA DE *Drosophila* (SMART Y U DE MANN-WHITNEY)

Cruza: hembras ORR(1); ORR(2); *flr3*/TM3, *Bd*(S) x machos *mwh/mwh*. (BE)
Orto-fenilenediamina

Compuesto [] en μ M	No.de Moscas	Frecuencia de manchas o clones por alas (Número de manchas por ala) Diagnóstico estadístico*			
		Manchas sencillas (1-2 células)	Manchas grandes (>2 células)	Manchas gemelas	Manchas totales
		M = 2.00	m = 5.00	m = 5.00	M = 2.00

b-1) Prueba SMART

Testigo agua 0.0	97	0.56 (54)	0.13 (13)	0.08 (8)	0.77 (75)
0.6	75	0.85 (64)+	0.7 (5)-	0.01 (1)-	0.93 (70)-
1.0	55	0.84 (46)+	0.13 (7)-	0.02 (1)-	0.98 (54)-
2.0	56	0.62 (35)-	0.21 (12)-	0.00 (0)-	0.84 (47)-

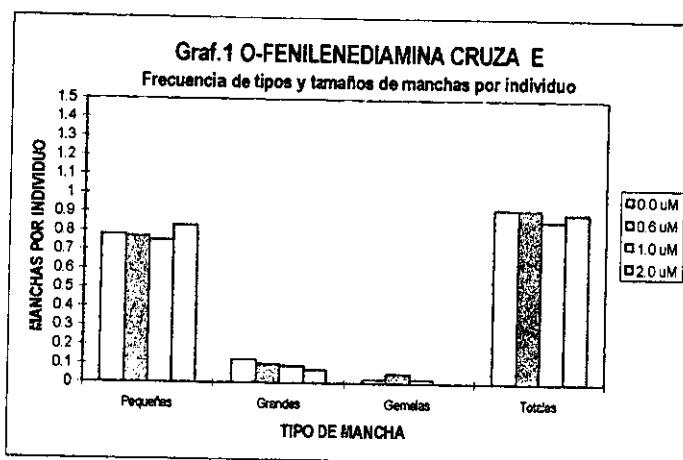
b-2) Prueba de U de Mann-Whitney

0.6	75	0.85 (64)*	0.7 (5)-	0.01 (1)-	0.93 (70)-
1.0	55	0.84 (46)*	0.13 (7)-	0.02 (1)-	0.98 (54)-
2.0	56	0.62 (35)-	0.21 (12)-	0.00 (0)-	0.84 (47)-

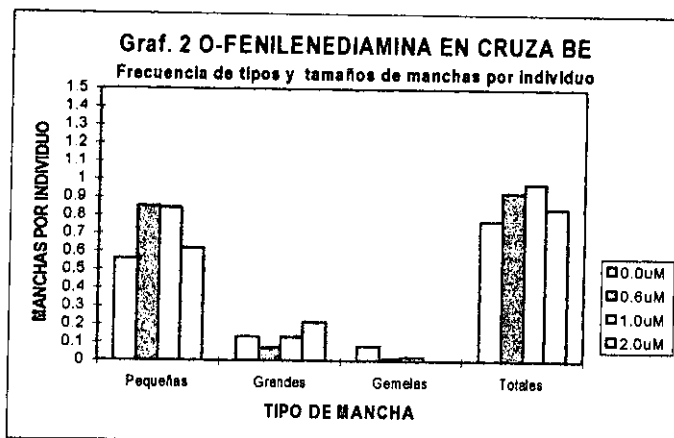
Para SMART: Diagnóstico estadístico de acuerdo a Frei y Wüergler, 1988: donde
+ = positivo; - = negativo; w = débil positivo; i = no concluyente. m = factor de multiplicación.

Nivel de probabilidad: $\alpha = \beta = 0.05$. Prueba estadística de una cola.

Para la prueba de U: - = negativo, * positivo con 95% de confianza (Frei y Wüergler, 1995)



Gráfica 1. Se muestra la frecuencia de los tipos y tamaños de manchas por individuo encontradas en organismos de la cruz E que fueron expuestos a 0.6, 1 y $2\mu\text{M}$ de OFD sin oxidar, así como al testigo negativo (H_2O). Se encontraron resultados negativos para todos los tipos y tamaños de manchas en todas las concentraciones utilizadas.



Gráfica 2. Se muestra la frecuencia de los tipos y tamaños de manchas por individuo encontradas en organismos de la cruz BE que fueron expuestos a 0.6, 1 y $2\mu\text{M}$ de OFD sin oxidar, así como al testigo negativo (H_2O). Se encontraron resultados positivos para manchas pequeñas en las dos primeras concentraciones de OFD utilizadas.

OFD OXIDADO

Con OFD oxidado en la cruza E, el efecto genotóxico se encontró positivo en manchas pequeñas y totales sólo a 0.6 μM . Los resultados son no concluyentes a 1 μM , lo cual puede deberse a que la toxicidad de esta amina oxidada produjo un número muy bajo de individuos, que no permite tener un resultado definido (Tabla 1.3 c-1; Graf.3). Así mismo, es importante recordar que en la concentración de 2 μM para esta cruza, no se obtuvieron organismos suficientes para realizar la prueba SMART, debido a la toxicidad del compuesto oxidado y a la sensibilidad de ésta cruza. Sin embargo, el primer resultado confirma que la oxidación de OFD es requisito para un observar efecto genotóxico, ya que aún en la cruza E a 0.6 μM se observa daño, comportándose como genotóxico, a diferencia de los resultados obtenidos en este cruza con OFD sin oxidar (Tabla 1.1) (Watanabe, *op.cit.*; Zito, *op.cit.*). Por otra parte, se encontraron resultados no concluyentes en manchas gemelas para ambas concentraciones, para discernir estos resultados se aplicó la prueba de U de Mann-Whitney.

Al aplicar la prueba de U se encontró que, al igual que en la prueba SMART, solo se obtuvieron resultados positivos para manchas pequeñas y totales para la concentración de 0.6 μM con un 99.9% de confianza. El resto de los tratamientos resultaron negativos para todos los tipos de manchas. Estos resultados, si bien, no nos permiten tener una visión clara del efecto de OFD oxidado en la cruza E, si da indicios de que la oxidación es un requisito clave para observar un efecto genotóxico, siendo este de tipo: mutación puntual, no-disyunción o recombinación en mitosis (Tabla 1.3 c-2). Así mismo, estos resultados, también nos permite decir que el compuesto, producto

de la oxidación del OFD, es altamente tóxico para esta cruz. Los resultados negativos obtenidos a 1 μM se deben probablemente al número de individuos analizados.

Al exponer a la cruz **BE** a OFD oxidado, se encontró lo siguiente: hay efecto genotóxico para manchas pequeñas a 0.6 μM , así como para pequeñas y totales a 2 μM . El efecto encontrado para esta amina oxidada, en la misma cruz, no fue solo para manchas pequeñas como ocurrió con el OFD sin oxidar, sino también en manchas totales (Tabla 1.4 d-1) y Gráfica. 4). Este resultado indica que, este compuesto previamente oxidado *in vitro*, pudo ser además activado por el citocromo P450, produciendo un mayor número de resultados positivos (Watanabe, *op. cit.*; Zito, *op. cit.*; Rodríguez-Amaiz y Hernández, *op. cit.*; Shahin, *op. cit.*; Chung, *op. cit.*). Con 1 μM los datos arrojaron un resultado no concluyente, esto debido probablemente al bajo número de individuos que se obtuvieron en esta concentración.

Con la prueba de U de Mann-Whitney se observaron los mismos resultados con un 95 y 99% de confianza, excepto para las manchas totales para 0.6 μM donde se obtuvo un resultado negativo. Al observar los resultados, encontramos no solo resultados positivos para manchas pequeñas sino, también para manchas totales, a diferencia de lo obtenido con OFD sin oxidar para esta cruz, lo anterior podría indicar un efecto acumulativo de la oxidación con la expresión constitutiva del citocromo P450, ya que la modificación de esta molécula por estos dos factores, podría estar favoreciendo la interacción de OFD activo con el DNA (Tabla 1.4 d-4).

Cabe mencionar que respecto a los resultados negativos encontrados en la concentración de 1 μM de OFD oxidado para esta cruz, originalmente se pensó en un error metodológico, sin

embargo, se observó el mismo patrón de mortalidad en esta concentración en los tres experimentos independientes. Según los resultados obtenidos en la tabla 1.3 y 1.4, se observa que tanto para la craza **E** como para la **BE** hay un mayor efecto tóxico del OFD oxidado.

Al parecer en la concentración 1 μM desciende el número de individuos para ambas cruza, sin embargo en la craza **BE** se vuelve a incrementar el número de organismos en la concentración de 2 μM , misma que en **E** resulto totalmente letal.

Estos resultados solo podrían ser explicados por la hipótesis planteada para la tabla 1.2, en donde en la tercera concentración, se induce la expresión de proteínas de estrés que ayudarían a la detoxificación, favoreciendo la sobrevivencia. Sin embargo, como en éstos tratamientos se emplea el OFD oxidado, si se presenta efecto genotóxico.

TABLA 1.3 RESUMEN DE RESULTADOS OBTENIDOS EN LA PRUEBA DEL ALA DE *Drosophila* (SMART Y U DE MANN-WHITNEY)

Cruza: hembras *flr3/TM3, Bd(S)* x machos *mwh/mwh*. (E)
Orto-fenilenediamina + H₂O₂ al 6% 1:1

		Frecuencia de manchas o clones por alas (Número de manchas por ala) Diagnóstico estadístico*			
Compuesto [] en μ M	No.de Moscas	Manchas sencillas (1-2 células)	Manchas grandes (>2 células)	Manchas gemelas	Manchas totales
		M = 2.00	m = 5.00	m = 5.00	M = 2.00

c-1) Prueba SMART

Testigo agua 0.0	118	0.78 (92)	0.12 (14)	0.02 (2)	0.92 (108)
0.6	48	1.38 (65)+	0.10 (5)-	0.02 (1)i	1.48 (71)+
1.0	10	1.0 (10)i	0.10 (1)-	0.10 (1)i	1.20 (12)i

c-2) Prueba de U de Mann-Whitney

0.6	48	1.38 (65)***	0.10 (5)-	0.02 (1)-	1.48 (71)***
1.0	10	1.0 (10)-	0.10 (1)-	0.10 (1)-	1.20 (12)-

Para SMART: Diagnóstico estadístico de acuerdo a Frei y Wüergler, 1988: donde + = positivo; - = negativo; w = débil positivo; i = no concluyente. m = factor de multiplicación.

Nivel de probabilidad: $\alpha = \beta = 0.05$. Prueba estadística de una cola.

Para la prueba de U: - = negativo; *** positivo con 99.9% de confianza. (Frei y Wüergler, 1995).

TABLA 1.4 RESUMEN DE RESULTADOS OBTENIDOS EN LA PRUEBA DEL ALA DE *Drosophila* (SMART Y U DE MANN-WHITNEY T)

Cruza: hembras ORR(1); ORR(2); *flr3/TM3, Bd(S)* x machos *mwh/mwh*. (BE)
Orto-fenilenediamina + H₂O₂ al 6% 1:1

Compuesto [] en μ M	No.de Moscas	Frecuencia de manchas o clones por alas (Número de manchas por ala) Diagnóstico estadístico*			
		Manchas sencillas (1-2 células)	Manchas grandes (>2 células)	Manchas gemelas	Manchas totales
		m = 2.00	m = 5.00	m = 5.00	m = 2.00

d-1) Prueba SMART

Testigo agua 0.0	97	0.56 (54)	0.13 (13)	0.08 (8)	0.77 (75)
0.6	59	0.92 (54)+	0.12 (7)-	0.00 (0)-	1.03 (61)w
1.0	20	0.8 (16)i	0.05 (1)-	0.05 (1)-	0.9 (18)-
2.0	39	1.03 (40)+	0.10 (4)-	0.08 (3)-	1.21 (47)+

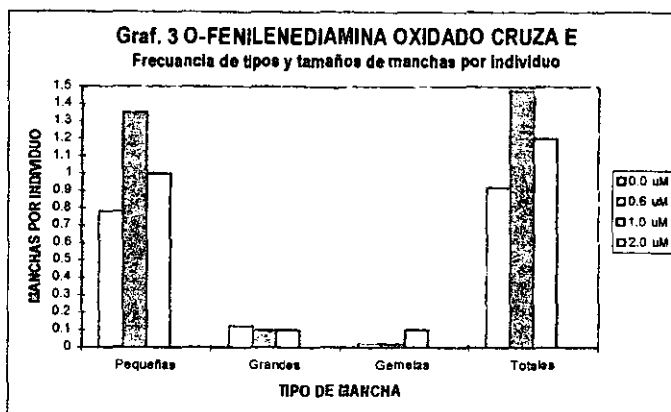
d-2) Prueba de U de Mann-Whitney

0.6	59	0.92 (54)*	0.12 (7)-	0.00 (0)-	1.03 (61)-
1.0	20	0.8 (16)-	0.05 (1)-	0.05 (1)-	0.9 (18)-
2.0	39	1.03 (40)**	0.10 (4)-	0.08 (3)-	1.21 (47)**

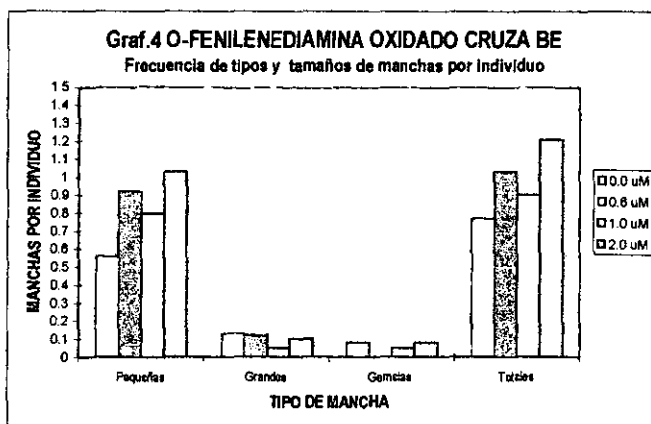
Prueba SMART: Diagnostico estadístico de acuerdo a Frei y Wüergler, 1988: donde
+ = positivo; - = negativo; w = débil positivo; i = no concluyente. m = factor de multiplicación.

Nivel de probabilidad: $\alpha = \beta = 0.05$. Prueba de una cola.

Prueba de U: *, ** positivos con 95% y 99% de confianza, respectivamente (Frei y Würigler, 1995).



Gráfica 3. Se muestra la frecuencia de los tipos y tamaños de manchas por individuo encontradas en organismos de la cruz **E** que fueron expuestos a 0.6, y 1 μM de OFD oxidado, así como al testigo negativo (H_2O). Se encontraron resultados positivos para manchas pequeñas y totales en la concentración de 0.6 μM OFD oxidado.



Gráfica 4. Se muestra la frecuencia de los tipos y tamaños de manchas por individuo encontradas en organismos de la cruz **BE** que fueron expuestos a 0.6, 1 y 2 μM de OFD oxidado, así como al testigo negativo (H_2O). Se encontraron resultados positivos para manchas pequeñas en la concentración de 0.6 y 2 μM de OFD oxidado y para manchas totales a 2 μM .

Basándose en los resultados obtenidos de la prueba SMART y de U-de Mann-Whitney en el presente trabajo, se sugiere que el OFD estaría actuando como agente intercalante, siendo posiblemente la causa de mutaciones puntuales, no-disyunción y eventos de recombinación en mitosis, que eventualmente serían el origen de algún proceso canceroso. Estos datos concuerdan con lo reportado por Chen, *et al*, 1997, quienes reportan que OFD y algunos de sus derivados producen reversiones por mutaciones puntuales en *Salmonella tifimorium* TA100. Al examinar otras líneas encontraron que los tipos de mutaciones puntuales más inducidas por ésta amina, son transiciones y transversiones T. Por otra parte, Satedler, *et al*, en 1999, encontraron un incremento en el número de transversiones G: C > T: A, y formaciones de aductos en el DNA en hígado de rata Big Blue, al exponerla a un tratamiento con un derivado de OFD, vía oral por 26 semanas, con dosis máximas de 200mg/kg.

CONCLUSIONES

- Las cruzas **E** y **BE** se comportaron según lo esperado frente al agua y al uretano, por lo que confirma la presencia de los marcadores genéticos en cada una de las cruzas.
- El OFD sin oxidar actúa como promutágeno, ya que no mostró efecto genotóxico positivo en la craza **E** con las concentraciones empleadas, confirmando así lo reportado para éste compuesto en la prueba de AMES.
- El OFD oxidado se comporta como mutágeno directo, observado efecto genotóxico positivo aún en la craza **E** que no cuenta con una expresión constitutiva del citocromo P450.
- La activación metabólica del OFD por el citocromo P450, es un factor que interviene en el efecto genotóxico positivo de esta amina. Lo anterior se confirma con los resultados positivos obtenidos en la craza **BE** tratada con OFD sin oxidar.
- Según lo observado en ambas cruzas, la oxidación *in vitro* de OFD incrementada la toxicidad de esta amina.

PROPUESTAS

Se sugiere que se realice el análisis de la inducción de las proteínas de estrés en larvas tratadas con OFD oxidado en las concentraciones de 0.6, 1 y 2 μ M en las cruas E y BE, con la finalidad de evaluar su participación en los resultados obtenidos para este bloque de experimentos en el presente trabajo.

Se propone realizar mayor investigación tanto epidemiológica como experimental en México, acerca del efecto genotóxico de compuestos puros o de la mezcla de uso comercial, con la finalidad de informar a la población de los posibles riesgos que tiene al exponerse a estos compuestos.

BIBLIOGRAFIA

1. Avendaño, L.M.C. 1993. "Introducción a la Química farmacéutica". Interamericana McGraw-Hill. México. p.p.157-195.
2. Batiste-Alentorn, M.; Xamena, N.; Creus, A. and R. Marcos. 1995. "Genotoxicity testing of five compounds in three *Drosophila* short-term somatic assays". *Mutat. Res.* 341:161-167.
3. Boffetta, P., Andersen, A. and Lynge, E. 1994. "Employment as hairdresser and risk of ovarian cancer and non-Hodkinis lymphomas among women". *J. Occup. Med.*, 36/1: 61-65.
4. Brown L.M.; Everett G.D.; Burmeister L.F.; Blair A. 1992 "Hair dye use and multiple myeloma in white men". *Am. J. Pub. Health* 82(12): 1673-1674.
5. Burnett, C., Loehr, R. y Corbett. 1977. "Dominant lethal mutagenicity study on hair dyes". *J. Tox. and Env. Health*, 2: 657-662.
6. Burnett, C.M., Re, T.A., Loehr, R.F., Rodriguez, S.C. and Corbett. 1986. "Evaluation of the teratological and dominant lethal potential of N,N-bis-(2-Hidroxyethyl)-P-phenilenediamine sulphate in a 6-month feeding study in rats". *Fd. Chem. Toxic.* 24/8: 875-880.
7. Burnett C. M. 1987. "Hair dye safety and toxicology". En: *Cosmetic safety. A primer for cosmetic scientists*. Wittam J.H. (de) *Cosmetic Science and Technology Series Vol. 5*.
8. Burnett, C.M. and Goldenthal, E.I., 1988. "Multigeneration reproduction and carcinogenicity studies in sprague-Dawley rats exposed topically to oxidative hair-coloring formulations containing p-phenilenediamine and other aromatic amine". *Fd. Chem. Toxic.* 29: 467-474.
9. Borquia A, Jabrane A.J., Ramdani B. and Zaid D. 1988. "Toxicite systemique de la p-phenylenediamine". *Quatre Obs. Presse Med* 17/35: 1798-1800.
10. Cantor K.P., Blair, A., Everett, G., Vanlier S., Burmeister L., Dick F.R., Gibson R.W. and Schuman L. 1988. "Hair dye use and risk of leukemia an lymphoma". *Am. J. Publ. Health* 78/5: 570-571.
11. Cebulska, W, A, Nowak, D., Kiedzwiedz, W., Anderson, D. 1998. "Correlations between DNA and cytogenetic damage induced after chemical treatment and radiation". *Mutat. Res.* 421/1: 83-91.
12. Centro Panamericano de Ecología Humana y Salud. Organización Panamericana de la Salud. Organización Mundial de la Salud. 1988. "Evaluación epidemiológica de riesgos causados por agentes químicos ambientales". Limusa. México, D.F. p.p.:179-200.
13. Chen, S.C., Wong, T.Y., Chung, K.T. 1997. "Base-pair mutation caused by four nitro-groups containing aromatic aminas in *Salmonella thyphimurium* TA100, TA104, TA4001 and TA4006." *Mutat. Res.*, 395/2-3: 223-227.
14. Chiapella, C., Radovan, R.D., Moreno, J.A., Casares, L., Barbé, J. y Liagostera, M. 2000. "Plant activation of aromatic amines mediated by cytochromes P450 and Flavin-containing monooxygenases". *Mutat. Res.*, 470: 155-160.
15. Chung, K-T., Murdock, CH. A., Stevens, S.E., Li, Y-S., Wei Ch-i, Huang, T-S. and Chou, M.W. 1995. "Mutagenicity and toxicity studies of p-phenilenediamina and its derivatives". *Tox. Let.*, 81:23-32.
16. Chung, K-T., Murdock, Ch. A., Zhuo, Y., Stevens, S.E., Li, Y-S., Wei, Ch-i., Fernando S.Y. y Chu, M-W. 1996. "Effects of the nitro-group on the mutagenicity and toxicity of some benzamines". *Env. and Mol. Mut.* 27: 67-74.

17. Colditz, C., 1994. "Hair dye and cancer reassuring evidences of no association". De. comment. J. Natl. Cancer Inst. 86/3: 210-215.
18. Cosmetic. Ingredient. Rev. Expert. Panel Staff (U.S.A.). 1992. "Final report on the safety assessment of 4-methoxy-m-phenylenediamina, 4-methoxy-m-phenylenediamina sulphate, and 4-methoxy-m-p-phenylenediamina hidrocloreto". J. Amer Coll 83/4: 598-599.
19. Delgado R.A. and Graf, U. 1994. "Latin American workshop on Genetic Toxicology. I. *Drosophila melanogaster*". Mutat. Res. 312:193-194.
20. Delgado R. A., Ortiz, M. R., Graf, U., Villalobos, P. R. and Gómez, A. S. 1995. "Genotoxic activity of environmental important polycyclic aromatic hydrocarbons and their nitro derivatives in the wing spot test of *Drosophila melanogaster*". Mutat. Res. 341:235-247.
21. Delgado-Rodríguez, A., Villalobos-Pietrini, R., Gómez-Arroyo, S. y Graf, U. 1994. Meeting Report. Latin American Workshop on Genetic Toxicology. I. *Drosophila melanogaster*. Mutat. Res. 312: 193-194.
22. Demerec, M. 1965. "Biology of *Drosophila*". Hafner Pub. Co. USA., pp. 633
23. Ferguson, L.R., Robertson, A.M. and Beriman, J. 1990. "Direct-acting mutagen properties of some hair dyes used in New Zealand". Mutat. Res., 245/1: 41-46.
24. Foye, W.O. 1991. "Principios de química farmacéutica". Reverté, S.A. Barcelona, España. p.p. 95-133.
25. Frei, H., y F.E. Würigler. 1988. "Statistical methods to decide whether mutagenicity test data from *Drosophila* assays indicate a positive, negative, or inconclusive result" Mutat. Res. 203: 297-308.
26. Frei, H., y F.E. Würigler. 1995. "Optimal experimental design and sample size for the statistical evaluation of data from somatic mutation and recombination test (SMART) in *Drosophila*." Mutat. Res. 334:247-258.
27. Frölich A. and Würigler F.E. 1989. "New tester strains with improved bioactivation capacity for the *Drosophila* wing spot test". Mutat. Res. 216: 179-187.
28. Frölich A. and Würigler F.E. 1990. "Genotoxicity of ethyl carbamate in the *Drosophila* Wing spot test: Dependence on genotype-controlled metabolic capacity". Mutat. Res. 244: 201-208.
29. García, B.A. y Dapena. J. 1974. "Induction, detection and characterization of cell differentiation mutants in *Drosophila melanogaster*". Mol.Gen. 128: 117-130.
30. García, B.A. y Merriam J.R. 1971. "Parameters of the wing imagal disc development of *Drosophila melanogaster*". Dev. Biol. 24: 61-87.
31. Gichner-T; López-G-C; Wagner-E-D; Plewa-M-J. (1994) Induction of somatic mutation in *Tradescantia* clone 4430 by three phenylenediamine isomers and the antimutagenic mechanisms of diethyldithiocarbamate and ammonium metavanadate. Mutat. Res., 306 (2):165-172.
32. Gichner-T. y Velemínsky, J., 1999. "Monitoring the genotoxicity of soil extracts from two heavily polluted sites in Prague using the *Tradescantia* stamen hair and micronucleus (MNC) assays". Mutat. Res., 426: 163-166.
33. Graf, U.; Würigler, F.E.; Katz, A.J.; Juon, H.; Hall, C.B; Kale, P.G. 1984. "Somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*". Env. Mutag. 6:153-188.
34. Graf, U. y Schaik, N., 1992. "Improved high bioactivation cross for the Wing Somatic Mutation and Recombination Test (SMART) in *Drosophila melanogaster*" Mutat. Res. 271:59-67.

35. Graf, U., Spanó, M. A., Guzmán-Rincon, J. Abraham, S. K. y Andrade, H. H. 1996. "The wing Somatic Mutation and Recombination Test (SMART) in *Drosophila melanogaster*. An efficient tool for the detection of genotoxic activity of pure compounds and complex mixtures as well as for studies on antigenotoxicity. Second Conference of Pan-African Environmental Mutagen Society (PAEMS)". 23-25 Jan. Manuscript for the African Newsletter on Occupational Health and Safety.
36. Graf, U. y Würgler. F.E.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*". *Env. and Mol. Mutag.* 27:219-226.
37. Grodstein, F., Hennekens, C.H., Colditz, G.A., Hunter, D.J., Stampfer, M.J. 1994. "A prospective study of permanent hair dye use and hematopoietic cancer". *J. Nat. Can. Inst. (Bethesda)* 86/19: 1466-1470.
38. Guzman-Rincón.J. and Graf U. 1995. "*Drosophila melanogaster* somatic mutation and recombination test as a biomonitor". F.M. Butterworth L.D. Plenum Publishinh Corp.
39. Hardell, L., Moss, A., Osmond, D. y Volberdins, P. 1987. "Exposure to hair dyes and polichlorinated dibenzo an AIDS patients with Kaposi sarcoma; an epidemiological investigation". *Can. Detec. Prev. Suppl.* 1987/1: 567-5670.
40. Harrinton,L.J., Weis, N.S., Koepsell, T.D., Dalind, J.R., Taylor, J.W., Lynon, J.L., Swason, G.M. y Greenberg, R.S. 1994. "Exposure to hair-coloring products and the risk of mieloma multiple". *Am. J. of Public Health.* 84/7: 1142-1144.
41. Jouhar, A.J. 1982. "Hair dye absorption". *Soap, Perfumery & Cosmetics.* 55(Nov):564-565, 576.
42. Kerckaert G.A.; LeBoeuf R.A. y Isfort R.J. 1998. "Assessing the predictiveness of the syrian hamster embryo cell transformation assay for determining the rodent carcinogenic potential of single ring aromatic/nitroaromatic amine compounds". *Tox. Sci.* 41(2):189-97.
43. Kiese,M; Ranchor, M; Rauscher,E: 1968. "The absorption of some phenylenediamines through the skin of dogs". *Tox. and App. Pharm.* 12: 495-507.
44. Koenig K.L., Pasternack B.S., Shore R.E. and Strax P. 1991. "Hair dye use and creast cancer: a case- control study among screening participants Amer". *J. Epid.* 133/10: 985-995.
45. Lawrence, P.A. 1992. "The marking of fly, The genetics of animal design". Blacwell Scientific Publication. U.S.A..
46. Lifshits N., Yagupsky P.and Sofer, S. 1993. "Fatal p-phenylenediamine (hair dye) intoxication in a child resembling Ludwig's angina". *J.Tox. Clin. Tox.* 33/4: 653-656.
47. Loomis, T.A., 1982. "Fundamentos de toxicología". Ed. Acriba. Zaragoza, España.
48. Marks, T.A., Gupta, B.N., Ledoux, T.A. y Staples, R.E. 1981. "Teratogenic evaluation of 2-Nitro-p-phenylenediamine, 4-Nitro-o-phenylenedamine, and 2,5-Toluenediamine sulfate in the mouse". *Terat.* 24: 253-265.
49. Mitchell i. y Combes R., 1984. "Mutation test with the fruit fly *Drodophila melanogaster*". Incluido en: Mutagenicity testing: a practical approach. Edited by S. Venintt, J.M. Pary, I.R. L. Pres., U.K. p 149-155.
50. Nasca P.C., Baptiste M.S., Field N.A., Metzger B.B. y DeMartino R. 1992. "An epidemiologic case-control study of breast cancer and exposed to hair dyes". *Ann. Epid.* 2(5):577-586.

51. Nomura A, Kolonel L.N. and Yoshizawa C.N. 1989. "Smoking, alcohol. Occupation and hair dye use in cancer of the lower urinary tract". Am. J. Epid. 130/6: 1159-1163.
52. Olshan A.F., P.D., Breslow N.E., Falletta J.M., Grufferman S., Pendergrass T., Robinson L.L., Waskerwitz M., Woods W. G., Vieti T. J., and Hammond G.D. 1993. "Risk factors for wilms tumor". Cancer. 72/3.
53. Overly T.J. 1990. "Mutagenicity evaluation of HC Blue No. 1 and HC Blue No. 2 III Effects in the *Salmonella typhimurium*- *Escherichia coli* reversion assay and the mouse lymphoma L5178Y TK+/-forward mutation assay". Mutat. Res. 241/2: 151-159.
54. Osterlind A, Tucker M.A., Stone B.J. y Jensen O.M., 1988. "The danish case-control study of cutaneous malignant melanoma. IV No. association with nutritional factors, alcohol, smoking or hair dyes". Int. J. Can. 42/6: 825-828.
55. Pearce, N. y Bethwait, P. 1992. "Increasing incidence of non-hodgkin's lymphoma: Occupational and environmental factor". Can. Res.: 52:5496s-5500s.
56. Ramos, P. 1993. Manual de laboratorios de genética para *Drosophila melanogaster*. Shaum, McGraw-Hill. México.
57. Ribeiro, C.V., Graf U., Reguly, M.L. y Rodríguez. A.H.H., 1997. "Recombinogenic activity of intergerimine, a pyrrolizidine alkaloid from *senecio brasiliensis*, in somatic cell of *Drosophila melanogaster*". Env. and Mol. Mutag. 29:91-97.
58. Rodríguez-Arnaiz, R y Hernández, A.J. 1994. "Activity of aromatic amine in the eye: w/w+ Somatic Assay of *Drosophila melanogaster*". Env. and Mol. Mutag. 24:75-79.
59. Russell, P., 1998. "Genetics". The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc. Fifth Edition U.S.A. 805pp.
60. Sardas, S., Aygün, N. y Karakaya, A.E. 1997. "Genotoxicity studies on professional hair colorist exposed to oxidation hair dyes". Mutat. Res., 394: 153-161.
61. Shahin, M.M. 1994. "Structure-activity relationship within various series of p-phenylenediamine derivatives." Mutat. Res., 307/1: 83-93.
62. Shibata, A., Sasaki, R., Hamajima, N. and Aoki, K., 1990. "Mortality of hematopoietic disorders and hair dye use among barbers". Nippon Ketsueki gakkai Zasshi, 52/1: 116-118.
63. Skov T., Andersen A. Malke H, Pukkala E., Weiner J. and Lynge E. 1990. "Risk for cancer of the urinary bladder among hairdressers in the Nordic countries". Amer J. Ind Med. 17/2: 217-223.
64. Skov T. and Lynge E, 1994. "Cancer risk exposures to carcinogens in hairdressers". Skin Pharm., 7/1-2: 94-100.
65. Spitz M.R., Fueger J.J., Geopfert H. y Newll G.R. 1990. "Salivary gland cancer. A case control investigation of risk factors". Arch. Otolar. l. Head. Neck Surg. 116/10: 11 63-1166.
66. Satedtler, F., Crespo-Pres, J., Sagelsdorff, P., Teiner, S., y Suter, W. 1999. "a-Cloro-o-phenylenediamine induces a dose-related increase in G:C > T:A transversions and one major DNA adduct in the liver of Big Blue mice after 26 Weeks in feed treatment". Mutat. Res. 430: 121-130.
67. Suter, W., Ahiabor, R., Blanco, B., Locher, F., Mantovani, F., Robinson, M., Sreecac, G., Staedtler, F., Swingler, T., Vignutelli, A. y Perentes, E. 1996. "Evaluation of the in vivo genotoxic potential of three carcinogenic aromatic amines using the big blue transgenic mouse mutation assay". Env. and Mol. Mutag., 28: 354-362.
68. Thun M.J., Altekruse S.F., Nambodiri M.M., Calle E.E., Myers D.G. y Heath C.W. 1994. "Hair dyes and risk of fatal cancer in United States women !See coments!". J.Natl. Can. Inst. 86/3: 210-215.

69. Tzonou A., Polychromopoulou A., Hsieh C.C., Rebalakos A., Karakatsani A. y Trichopoulos D. 1993. "Hair dyes, analgesics, tranquilizers and perineal talc application as risk factors for ovarian cancer". *Int. J. Cancer* 55/3: 408-410.
70. Vandemmia S., Di Meo F., Coppola R., Maurino V., Perri D. y Griffo A. 1992. "Pland syndrome". *Minerva Pe diarts.* 44/12: 607-611.
71. Vogel, E.W., 1991. "Genotoxic chemical. An introduction into basic principle of Genetic Toxicology". Apuntes del Primer Taller Latinoamericano en Genética Toxicológica en *Drosophila melanogaster*. Tlaxcala, México. Sin Publicar.
72. Vogel, E.W., Graf, U., Frei, H.J. y Nirvard, M.M.J. 1999. "The results of assays in *Drosophila* as indicators of exposure to carcinogens". *Int. Agen. for Res. of Can., Lyon*: 146: 427-470.
73. Wang, L.L., Li, S.S., Qin, Y.H., Xu, F.D., Wang, Z.S. Song, X.D. y Li, J. 1991. "Studies on the mutagenicity of hair dyes made in China". *Bioned Eviron Sci*, 4/3: 310-316.
74. Watanabe T., Hirayama T. y Fukui S. 1989. "Phenazine derivatives as the mutagenic reaction product from o- or m-phenylenediamina derivatives whith hydrogen peroxide". *Mutat. Res.*, 227/3: 35-45.
75. Watanabe T., Hirayama T. y Fukui S. 1990. "Mutagenecity of commercial hair dyes and detection of 2, 7-diaminophenzine". *Mutat. Res.* 244/4: 303-308.
76. Wild, D.; Ming-Tzan, K.; y Eckhardt, K. 1980. "Cytogenetic Effect of ortho-phenylenediamine in the mouse, chinese hamster, and guinea pig and derivatives, Evaluated by the Micronucleus Test". *Arch. Tox.* 43, 249-255.
77. Windhofz, M., Budavari, S., Streumtsos, L.Y. y Noetherfering, M., 1995. "The Merck Index". Ed. Merck and CO., INC. U.S.A.
78. Zito, R. 1982. "Mutagenicity of commercial hair dyes in *Salmonella typhimorium* TA98". *Fd. Chem. Toxic.* 20: 171-175.

ESTA TESIS NO DEBE
SER BORRADA DE LA BIBLIOTECA