

00361

6



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS
División de Estudios de Posgrado

EFFECTO MUTAGÉNICO Y RECOMBINOGÉNICO DE LA P-FENILENEDIAMINA Y LA O-FENILENEDIAMINA, MEDIANTE LA PRUEBA DE MUTACIÓN SOMÁTICA EN ALAS DE Drosophila melanogaster CRUZAS E Y AB.

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE MAESTRA EN CIENCIAS (BIOLÓGIA) Presenta IRMA ELENA DUENAS GARCÍA

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

Director de Tesis: Dr Ulrich Graf

2002



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.

DEDICATORIAS

A Ricardo Gerardo, compañero de vida y amado esposo, porque siempre ha sido mi mejor amigo, porque hemos crecido juntos y porque este es otro logro de ambos.

A mis hijas: Itzel Alejandra y Eréndira del Rocío. Porque son la razón de mi vida y porque espero que este trabajo les sirva de inspiración.

A la memoria de mi padre: Salvador W Dueñas Sosa. Porque es mi ejemplo a seguir y por enseñarme a vivir y morir con dignidad.

A mi querida madre: Magdalena García, por su amor y apoyo incondicionales en todo lo que he emprendido en mi vida.

A mis hermanos: Rocío, Adriana, Juan Carlos y Salvador. A ellas en especial porque gracias a la solidaridad que siempre han tenido conmigo y con mis hijas he podido seguir avanzando.

A todos mis sobrinos: Rodrigo Alonso, Salvador, Ricardo, Adriana Paola, Nidia Karen, Carlos Salvador y Erick Salvador; también a Jessica Alejandra, Zyanya Fernanda, Xchel Alejandro y Miguel Ángel; pero en especial a Sebastián por el entusiasmo que siempre mostró hacia este trabajo.

A mis suegros: Ricardo y Socorro

A mis cuñados: Jorge, Pablo, Miguel Ángel, Fernando, Tere y Nancy

A todos mis amigos.



AGRADECIMIENTOS:

Al Dr. Ulrich Graf por haber aceptado dirigir este trabajo, por sus consejos, por su paciencia y su valiosa amistad

Al Dr. Hansjörg Frei, en Suiza y a los profesores Ángel Durán y Agustín Vargas de la FES-Iztacala, por la asesoría estadística, indispensable para la realización de este trabajo.

A las biólogas Araceli Rosales y Gisela Edith Rangel por su valiosa colaboración en la realización de este trabajo.

A la M. en C. María Eugenia Heres por haberme invitado a participar en su “locura”.

A los doctores miembros del jurado: Dr. Rafael Villalobos Pietrini, Dra. Sandra Gómez Arroyo, Dra. Rosario Rodríguez Arnaiz, Dra. Patricia Ramos, Dra. Judith Guzmán y Dr. Mario Altamirano, gracias por su tiempo, su paciente revisión y por sus consejos y comentarios con los que se ha enriquecido este trabajo.

A L'Oréal México por la donación de la *p*-fenilendiamina.

INDICE:

	Página
1. Resumen	1
2. Introducción	2
2.1. Consideraciones sobre Toxicología Genética, mutágenos, recombinógenos y cancerígenos.....	2
2.2. Detección de xenobióticos ambientales.....	5
2.3. Genotoxicidad como consecuencia de la biotransformación de xenobióticos	6
2.3.1. Enzimas que participan en la biotransformación	7
2.4. Tintes para cabello	9
2.4.1. <i>p</i> -Fenilendiamina.....	11
2.4.2. <i>o</i> -Fenilendiamina.....	12
2.5. <i>Drosophila melanogaster</i>	13
2.6. Prueba de Mutación y Recombinación Somáticas (SMART)	16
2.6.1. Líneas y Marcadores.....	17
2.6.2. Cruzas.....	18
2.6.3. Información generada y poder de resolución	20
3. Antecedentes.....	23
3.1. Toxicidad y teratogénesis de los tintes para cabello.....	23
3.2. Penetración por piel de los componentes de los tintes para cabello.....	23
3.3. Antecedentes epidemiológicos.....	24
3.4. Antecedentes experimentales.....	25
3.4.1. Mezclas comerciales y fórmulas prototipo	25
3.4.2. Aminas aromáticas.....	27
4. Objetivos	30
4.1. Objetivo general	30
4.2. Objetivos particulares.....	30
5. Hipótesis.....	30

INDICE

	Página
6 Diseño.....	31
6.1. Hipótesis estadística.....	32
7. Materiales y métodos.....	33
7.1 Fase 1.....	33
7.2. Fase 2.....	33
7.3. Material biológico.....	34
7.4 Metodología general.....	34
8. Resultados y discusión.....	37
8.1. Fase 1. Mezcla comercial.....	37
8.1.1. Crema colorante (Tinte).....	38
8.1.2. Crema reveladora (Revelador).....	41
8.1.3. Tinte + Revelador.....	44
8.2 Fase 2. Aminas nitroaromáticas.....	47
8.2.1. <i>p</i> -Fenilendiamina sin oxidar.....	47
8.2.2. <i>o</i> -Fenilendiamina sin oxidar.....	51
8.2.3. <i>p</i> -Fenilendiamina oxidada.....	55
8.2.4. <i>o</i> -Fenilendiamina oxidada.....	59
9 Conclusiones y recomendaciones.....	65
9.1 Fase 1.....	65
9.2 Fase 2.....	66
10 Referencias.....	67

INDICE DE TABLAS Y FIGURAS.

Página

INTRODUCCIÓN

☞	Tabla 2.4.1. Colores producidos por la <i>p</i> -fenilendiamina en presencia de varios acopladores.	11
☞	Figura 2.4.1. Dos posibilidades de reacción al oxidar la <i>p</i> -fenilendiamina con peróxido de hidrógeno	12
☞	Tabla 2.5.1. Bioensayos a corto plazo en <i>Drosophila melanogaster</i>	14
☞	Figura 2.5.1. Ciclo de vida de <i>D. melanogaster</i>	15
☞	Figura 2.5.2. Distribución de los discos imagales en la larva de <i>D. melanogaster</i>	16
☞	Figura 2.6.1. Fenotipos y genotipos recuperados en la F1 de las cruzas Estándar y de Bioactivación Elevada	19
☞	Figura 2.6.2. Eventos que conducen a la pérdida de heterocigosis, en la prueba del ala SMART	21
☞	Figura 2.6.3. Mancha gemela (clones <i>mwh</i> y <i>flr³</i> adyacentes)	22

ANTECEDENTES

☞	Tabla 3.3.1. Estudios epidemiológicos de asociación entre el uso o contacto laboral de los tintes para cabello y el riesgo de contraer algún tipo de cáncer	26
☞	Tabla 3.4.1. Estudios experimentales, donde se han probado las <i>o</i> y/ o <i>p</i> -fenilendiaminas, en bioensayos a largo y corto plazo.....	28

MATERIALES Y MÉTODOS

☞	Figura 6.1. Diseño experimental de la fase 1 (mezcla comercial y sus componentes; crema colorante y crema reveladora)	31
☞	Figura 6.2. Diseño experimental de la fase 2 (<i>o</i> - y <i>p</i> -fenilendiamina sin y con oxidación con peróxido de hidrógeno)	32

INDICE DE TABLAS Y FIGURAS.

Página

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

☞	Tabla 8.1.1. Resultados obtenidos en el ensayo del ala de <i>Drosophila</i> , SMART. (crema colorante).....	38
☞	Figura 8.1.1.a. Gráfica de barras (frecuencia por mosca de cada uno de los tipos de manchas o clones, a las diferentes dosis probadas). Crema colorante. Cruza estándar.....	39
☞	Figura 8.1.1.b. Gráfica de barras (frecuencia por mosca de cada uno de los tipos de manchas o clones, a las diferentes dosis probadas) Crema colorante Cruza de bioactivación elevada.....	40
☞	Tabla 8.1.2. Resultados obtenidos en el ensayo del ala de <i>Drosophila</i> , SMART. (crema reveladora).....	41
☞	Figura 8.1.2.a. Gráfica de barras (frecuencia por mosca de cada uno de los tipos de manchas o clones, a las diferentes dosis probadas). Crema reveladora. Cruza estándar.....	42
☞	Figura 8.1.2.b. Gráfica de barras (frecuencia por mosca de cada uno de los tipos de manchas o clones, a las diferentes dosis probadas) Crema reveladora. Cruza de bioactivación elevada.....	43
☞	Tabla 8.1.3. Resultados obtenidos en el ensayo del ala de <i>Drosophila</i> , SMART. (crema colorante + crema reveladora).....	44
☞	Figura 8.1.3.a. Gráfica de barras (frecuencia por mosca de cada uno de los tipos de manchas o clones, a las diferentes dosis probadas) Crema colorante + crema reveladora. Cruza estándar.....	45
☞	Figura 8.1.3.b. Gráfica de barras (frecuencia por mosca de cada uno de los tipos de manchas o clones, a las diferentes dosis probadas) Crema colorante + crema reveladora. Cruza de bioactivación elevada.....	46
☞	Tabla 8.2.1. Resultados obtenidos en el ensayo del ala de <i>Drosophila</i> , SMART. (<i>p</i> -Fenilendiamina sin oxidar).....	48

INDICE DE TABLAS Y FIGURAS.

Página

☞	Figura 8.2.1.a. Gráfica de barras (frecuencia por mosca de cada uno de los tipos de manchas o clones, a las diferentes dosis probadas). <i>p</i> -Fenilendiamina sin oxidar. Cruza estándar ...	49
☞	Figura 8.2.1.b. Gráfica de barras (frecuencia por mosca de cada uno de los tipos de manchas o clones, a las diferentes dosis probadas). <i>p</i> -Fenilendiamina sin oxidar. Cruza de bioactivación elevada.	49
☞	Figura 8.2.1.c. Gráfica 3D (frecuencia de clones <i>mwh</i> por mosca, de diferente número de células a las diferentes dosis probadas). <i>p</i> -Fenilendiamina sin oxidar. Cruza de bioactivación elevada.	50
☞	Tabla 8.2.2. Resultados obtenidos en el ensayo del ala de <i>Drosophila</i> , SMART (<i>o</i> -Fenilendiamina sin oxidar)	51
☞	Figura 8.2.2.a. Gráfica de barras (frecuencia por mosca de cada uno de los tipos de manchas o clones, a las diferentes dosis probadas) <i>o</i> -Fenilendiamina sin oxidar. Cruza estándar.....	52
☞	Figura 8.2.2.b. Gráfica de barras (frecuencia por mosca de cada uno de los tipos de manchas o clones, a las diferentes dosis probadas). <i>o</i> -Fenilendiamina sin oxidar. Cruza de bioactivación elevada.	53
☞	Tabla 8.2.3. Resultados obtenidos en el ensayo del ala de <i>Drosophila</i> , SMART (<i>p</i> -Fenilendiamina oxidada con peróxido de hidrógeno)	55
☞	Figura 8.2.3.a. Gráfica de barras (frecuencia por mosca de cada uno de los tipos de manchas o clones, a las diferentes dosis probadas). <i>p</i> -Fenilendiamina oxidada. Cruza estándar.	56
☞	Figura 8.2.3.b. Gráfica de barras (frecuencia por mosca de cada uno de los tipos de manchas o clones, a las diferentes dosis probadas) <i>p</i> -Fenilendiamina oxidada. Cruza de bioactivación elevada.	57
☞	Figura 8.2.3.c. Gráfica 3D (frecuencia de clones <i>mwh</i> por mosca, de diferente número de células a las diferentes dosis probadas) <i>p</i> -Fenilendiamina oxidada. Cruza de bioactivación elevada ...	58
☞	Tabla 8.2.4. Resultados obtenidos en el ensayo del ala de <i>Drosophila</i> , SMART (<i>o</i> -Fenilendiamina oxidada)	59

INDICE DE TABLAS Y FIGURAS.

	Página
☞ Figura 8.2.4.a. Gráfica de barras (frecuencia por mosca de cada uno de los tipos de manchas o clones, a las diferentes dosis probadas) <i>o</i> -Fenilendiamina oxidada. Cruza estándar.	60
☞ Figura 8.2.4.b. Gráfica 3D (frecuencia del número de manchas por mosca a las diferentes dosis probadas). <i>o</i> -Fenilendiamina oxidada. Cruza de bioactivación elevada.	61
☞ Figura 8.2.4.c. Gráfica de barras (frecuencia por mosca de cada uno de los tipos de manchas o clones, a las diferentes dosis probadas). <i>o</i> -Fenilendiamina oxidada. Cruza de bioactivación elevada.....	62

1. RESUMEN

Estudios epidemiológicos indican que aquellas personas que tiñen su cabello frecuentemente o que tienen contacto laboral con tintes permanentes incrementan el riesgo de contraer ciertos tipos de cáncer. Existen trabajos experimentales que demuestran la penetración a través de la piel de algunos componentes de los tintes, después de la aplicación tópica. Mezclas comerciales y sus componentes, entre ellos las aminas nitroaromáticas *o*-fenilendiamina (OFD) y *p*-fenilendiamina (PFD), han resultado positivos en bioensayos con *Salmonella typhimurium* y *Tradescantia*, donde estas últimas fueron más mutagénicas al ser oxidadas y/ o activadas por lo que se les clasifica como promutágenos. Sin embargo, existen otros trabajos donde se reporta que ni el tinte, ni sus componentes tienen efecto cancerígeno o mutagénico. Dada la controversia, y para contribuir con información sobre el efecto genotóxico de los tintes para cabello y sus componentes, se aplicó la Prueba de Mutación y Recombinación Somáticas SMART en las alas de *Drosophila melanogaster*, que detecta diferentes tipos de mutaciones, así como recombinación mitótica. Se basa en la pérdida de heterocigosis, de dos marcadores recesivos (*flr*^r y *mwh*), que se expresan como tricomas modificados en las alas. Se probó una mezcla comercial, sus componentes (cremas colorante y reveladora) y las OFD y PFD oxidadas (1:1 con H₂O₂ al 6 %) y sin oxidar; en tres dosis distintas cada una. Se emplearon de manera simultánea las cruza estándar (E) y de bioactivación elevada (BE), que se caracterizan por presentar niveles regulados y constitutivos del citocromo P450, respectivamente. Se realizaron tres ensayos independientes, con tres repeticiones cada uno. Al analizar los resultados, se asumió la presencia de promutágenos en la crema colorante y que la crema reveladora contiene mutágenos y promutágenos, sin poder definir cual de los componentes de esta última era el responsable. Para la mezcla, se obtuvieron resultados positivos en la cruz a estándar, por lo que se discute que la oxidación *in vitro* activa algunos de los componentes de la crema colorante. En cuanto a las aminas aromáticas, se notó que la PFD oxidada, podría ser un promutágeno débil y que la OFD oxidada y sin oxidar se comportó como promutágeno. Se evidenció mayor efecto genotóxico en la OFD que en la PFD, y que la oxidación de estas aminas incrementa su efecto genotóxico, presentándose la siguiente jerarquía: OFD oxidada > OFD sin oxidar > PFD oxidada > PFD sin oxidar.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

2. INTRODUCCIÓN

2.1. Consideraciones sobre Toxicología Genética, mutágenos, recombinógenos y cancerígenos

La Toxicología Genética es una especialidad de la toxicología, que identifica y analiza la acción de los agentes cuya toxicidad recae en el material hereditario de los seres vivos, detecta y comprende las propiedades de un grupo relativamente pequeño de agentes conocidos como genotoxinas, las cuales son altamente específicas para afectar a los ácidos nucleicos, particularmente el ADN. El término genotóxico fue introducido en la década de los setenta por Ehrenberg (Citado en Vogel, 1991) y se aplica a los agentes tóxicos que afectan el material genético produciendo cambios letales o hereditarios en células somáticas o germinales e incluye tanto a los agentes mutagénicos como a los recombinogénicos

La Toxicología Genética es reconocida como disciplina alrededor de 1969, cuando se empieza a relacionar el incremento en el ambiente de los productos químicos fabricados por el hombre con sus posibles consecuencias genéticas. Sin embargo, su inicio se puede situar en dos experimentos que demostraron que agentes externos, físicos o químicos, son capaces de producir cambios en el material genético de *Drosophila melanogaster*. El primero realizado por H. J. Müller en 1927 con los Rayos X y el segundo por Auerbach y Robson en 1949, con el gas mostaza. Durante los 20 años siguientes fue demostrado el cambio genético inducido por radiaciones y agentes químicos, en animales de laboratorio. Estos trabajos dieron la pauta para considerar que algunas enfermedades hereditarias observadas en poblaciones humanas tuvieran un posible origen ambiental. Simultáneamente se empezó a observar una correlación entre los agentes que producen mutaciones (mutágenos) con aquellos que causan cáncer (cancerígenos). Esto hace que esta disciplina se interese por los diversos efectos adversos en la salud que pueden producir los compuestos genotóxicos, ya que por un lado, éstos pueden afectar a las células germinales, trayendo como consecuencia una mutación hereditaria o infertilidad, o a las células somáticas ocasionando muerte celular o cáncer (Vogel, 1991)

El posible origen ambiental del cáncer fue sugerido hace más de dos siglos cuando Hill, en 1761, correlacionó la presencia de pólipos nasales en la gente expuesta al tabaco (Redmond, 1970) y Percival Pott en 1775 relacionó el carcinoma de escroto, que presentaban algunos

deshollinadores ingleses, con el continuo contacto con el hollín (Cortinas, 1995). El concepto de que el cáncer está asociado con cambios en el material genético fue propuesto por Boveri en 1914 y en 1928 Bauer formuló la teoría de la mutación somática, que establece que el desarrollo de un tumor canceroso se inicia con una mutación en una célula somática, por lo que se asumió que la mayoría de los cancerígenos químicos deberían ser también mutagénicos, esto es: los cancerígenos químicos afectan la estructura del ADN. Sin embargo, al principio de la década de los sesenta esta idea se puso en duda, al carecer de efecto mutagénico varios de los cancerígenos conocidos en los sistemas genéticos de prueba, establecidos hasta esa época. La situación cambió cuando se reconoció que la mayoría de los agentes cancerígenos sólo son biológicamente activos seguidos de activación metabólica (Vogel, 1991).

La recombinación y la mutación son fenómenos universales de gran importancia en los sistemas biológicos, desde los virus hasta los eucariotes superiores. Estos procesos contribuyen a la variabilidad genética y tienen gran importancia desde el punto de vista evolutivo. En 1936, Curt Stern (Spanó *et al.*, 2001) demostró que la recombinación también puede ocurrir en células somáticas, durante la mitosis y no solamente en meiosis. Últimamente se ha demostrado que la recombinación es un fenómeno importante en otras funciones celulares, tales como la reparación del ADN y en la generación de variación en las inmunoglobulinas de mamíferos (Engler y Strob, 1988).

En Toxicología Genética, se ha dado énfasis principalmente a las alteraciones genéticas tradicionales, tales como mutación puntual o génica, aberraciones cromosómicas y más recientemente aneuploidías. Aunque también se han desarrollado pruebas para detectar recombinación mitótica, sobre todo en levaduras (Zimmermann *et al.*, 1966 en: Spanó *et al.*, 2001). Es evidente que muchos agentes que causan daño al ADN, también son recombinogénicos. Se ha visto que la recombinación puede ser responsable de la pérdida de heterocigosis en células germinales y somáticas, en consecuencia, puede promover la expresión de enfermedades hereditarias, causadas por alelos recesivos o puede estar envuelta en la progresión de neoplasias. Este mecanismo ha mostrado ser la causa de la expresión de varios oncogenes y de genes supresores de tumor (Bishop, 1991; Marshall, 1991; Sengstag, 1994; Happle, 1999), de ahí la importancia de detectar la actividad recombinogénica de un agente químico, cuando se está evaluando, de manera experimental, la seguridad de su uso.

Los cancerígenos son agentes físicos o químicos que pueden promover cáncer, y estos pueden ser de tres tipos: 1. Genotoxinas que alteran directamente al ADN, 2. Genotoxinas indirectas que afectan la replicación o reparación del ADN y 3. Agentes químicos promotores de tumores que ejercen un efecto epigenético, por ejemplo activación de señales de mitosis.

El alto grado de correlación que existe entre genotoxinas y cancerígenos es un fuerte indicador de una relación funcional íntima, sumado a las siguientes observaciones (Cortinas, 1995):

a) Aparentemente los tumores tienen origen clonal, lo cual es evidencia de que una sola célula lo puede originar y esto último es consistente con la teoría de la mutación somática.

b) Las células transformadas tienen propiedades fenotípicas diferentes de las no transformadas, esto podría deberse a que un cambio genotípico ha producido una modificación fenotípica, sobre todo si se considera que:

b.1) Las células transformadas transmiten sus propiedades fenotípicas a su descendencia, lo que demuestra que el control de la malignidad está asociado con los componentes hereditarios.

b.2) La existencia de oncogenes celulares (genes que inician la formación de tumores), cuyos alelos silvestres o protooncogenes, codifican para proteínas relacionadas con la regulación de la proliferación celular.

c) Los humanos que padecen *Xeroderma pigmentosum*, deficientes en la reparación por escisión de nucleótidos en el ADN, son más susceptibles a los agentes mutagénicos y también experimentan mayor susceptibilidad al cáncer.

d) Existen genealogías en las que, en cada una de las generaciones, se presentan casos de cáncer en varios miembros de la familia, lo que sugiere un modo de transmisión hereditaria, se calcula que los cánceres de este tipo son aproximadamente el 1 % del total de los casos de esta enfermedad.

2.2. Detección de xenobióticos ambientales

Actualmente los seres humanos se exponen a un sinnúmero de productos industriales sintéticos que se han venido a añadir a los de origen natural y que se utilizan como aditivos de alimentos, cosméticos, medicamentos, productos de limpieza, plaguicidas y fertilizantes, entre otros. Se han analizado desde la perspectiva de la Toxicología Genética alrededor del 10 % de estos productos, encontrando que aproximadamente el 10 % de estos últimos son genotóxicos (Vogel, 1991).

El conocimiento de los factores ambientales que pueden afectar a la salud, ha tenido un fuerte impulso, sobre todo con respecto a los contaminantes del ambiente laboral y los medicamentos de uso prolongado. El riesgo de contraer cáncer por factores ambientales es más grande cuando se incrementa la exposición al agente químico o físico, ya sea en una dosis muy alta o en pequeñas dosis por periodos largos de tiempo. Para identificar y analizar la acción directa o la indirecta de agentes que pudieran modificar a los componentes hereditarios de los sistemas vivos y detectar las propiedades de un grupo de agentes que pudieran inducir cambios a los ácidos nucleicos y/ o producir efectos deletéreos en las dos estirpes celulares (somáticas y germinales), es necesario recurrir al uso de algunas pruebas, ya que no es ético exponer a las personas a los posibles cancerígenos ambientales. La información acerca de sus efectos se puede obtener de distintas maneras, tales como:

1 - Estudios epidemiológicos: la incidencia de cierto tipo de cáncer se mide al comparar subgrupos, con diferentes niveles de exposición al cancerígeno, en una gran población. Los estudios epidemiológicos son la fuente más efectiva para establecer el riesgo de padecer algún tipo de cáncer en poblaciones expuestas a contaminantes ambientales, sin embargo, tienen limitaciones para descubrir nuevos cancerígenos entre los muchos agentes a los cuales se está expuesto y que son (Vega, 1988):

- a) Tiempo prolongado de latencia entre exposición y manifestación clínica.
- b) Participación de muchos factores en el desarrollo de la enfermedad, entre los que se encuentran la predisposición diferencial y el azar.
- c) No poder determinar la magnitud de una exposición de tiempo atrás

2 - Experimentos naturales: si una población natural es expuesta accidentalmente a niveles

altos de un probable cancerígeno ambiental, es posible estudiarla mas tarde y compararla con la población en general, para determinar si la exposición a este agente incrementó el riesgo de contraer cierto tipo de cáncer.

3 - Estudios con animales o bioensayos a largo plazo: se realizan al exponer a mamíferos (generalmente ratas o ratones) a dosis altas de un compuesto supuestamente cancerígeno en tratamientos crónicos o agudos y medir los efectos. De esta forma los investigadores pueden asumir lo que podría ocurrir en humanos. Estas extrapolaciones, que son discutibles, pueden ser muy útiles cuando no hay otra forma de medir el efecto de cierto compuesto

4 - Pruebas de laboratorio o bioensayos a corto plazo: existen gran cantidad de ensayos que involucran bacteriófagos, bacterias, hongos, insectos, vegetales o cultivo de células, que se exponen de forma controlada, a los agentes sospechosos y son usados cuando se considera que un compuesto puede alterar al ADN. Éstos son usados para tamizar los posibles cancerígenos. Las pruebas de lapsos cortos 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 ADN).

Würgler, en 1992, propone que además se deben diseñar sistemas capaces de medir de manera cuantitativa la actividad recombinogénica (Spanó *et al.*, 2001)

2.3. Genotoxicidad como consecuencia de la biotransformación de xenobióticos

Las genotoxinas pueden ser divididas en dos tipos: las llamadas **directas** que afectan *per se* al material hereditario y las que requieren ser activadas metabólicamente para dañar al ADN, conocidas como **indirectas** o **promutágenos**. La mayoría de las genotoxinas, poco más del 80 %, corresponden a este grupo (Vogel, 1991).

Cuando las genotoxinas se encuentran en la vecindad inmediata de las vías de ingreso al organismo (inhalación, absorción o ingestión), el contaminante pasa a través de las membranas a

la circulación sistémica (pulmonar, cutánea o gastrointestinal). El xenobiótico¹ es distribuido hacia los tejidos corporales donde es absorbido, biotransformado², retenido y acumulado en ciertos tejidos o excretado por orina y/ o heces. Los agentes químicos hidrosolubles se excretan fácilmente, sin embargo, aquellos que son liposolubles no se excretan o lo hacen lentamente. Para que este último grupo de compuestos puedan ser excretados, requieren su biotransformación. Dentro de la transformación metabólica existen dos fases: en la fase I, los compuestos son oxidados, reducidos o hidrolizados, convirtiéndose en productos hidrosolubles. En la fase II o de conjugación, se unen moléculas tales como péptidos, sulfatos, acetilo o ácido glucorónico, entre otros, a los productos que resultan de la fase I, y que aún no han sido eliminados. Estos conjugados son ya estables e hidrosolubles y se excretan rápidamente del organismo (Centro Panamericano, 1988; Foye, 1991; Avendaño, 1993)

Si el xenobiótico es tóxico, entonces la eficiencia de los sistemas enzimáticos de la fase I es de primordial importancia para eliminarlo rápidamente. En el caso de que se trate de un compuesto inocuo, pero que, como consecuencia del metabolismo, se transforme en tóxico (lo que se conoce como un pre-tóxico), la eficiencia de eliminación de éste, dependerá del balance entre las reacciones de la fase I que están produciendo el metabolito activo y las reacciones de la fase II que lo desactivan y facilitan su eliminación (Centro Panamericano, 1988; Foye, 1991; Avendaño, 1993). Con excepción de los agentes alquilantes, los genotóxicos no tienen actividad *per se*, sólo cuando son biotransformados. Los productos intermedios (fase I) del metabolismo de los genotóxicos son especies químicas muy reactivas que contienen átomos deficientes en electrones o iones positivos (electrofilicos) que reaccionan con las macromoléculas (ácidos nucleicos y proteínas) provocando alteraciones que dan como resultado mutaciones y/ o el desarrollo de células cancerosas

2.3.1. Enzimas que participan en la biotransformación

La fase I se lleva a cabo por un mecanismo de monoxigenación³. Las enzimas responsables

¹ Xenobióticos: aquellas sustancias que no son utilizables en ciclos generadores de energía ni en reacciones de síntesis del organismo.

² Biotransformación: sinónimo de metabolismo que se utiliza exclusivamente con relación a los xenobióticos

³ Un átomo de oxígeno se incorpora al sustrato mientras que otro átomo de oxígeno forma agua

son las monoxigenasas polisustrato, monoxigenasas mixtas o sistemas de citocromo P450

Cientos de sustancias son sustratos del sistema de las monoxigenasas mixtas (endobióticas y xenobióticas), lo único que parecen tener en común estos sustratos es su liposolubilidad.

El sistema de citocromo P450, comprende toda una familia de isoenzimas. Éstas son inducibles, dependiendo de una señal genética que a su vez es inducida por la presencia de un xenobiótico. Se conocen más de 200 drogas, cancerígenos y contaminantes, que inducen su propio metabolismo y/ o el de otros componentes, es decir, una sustancia puede ser a la vez sustrato e inductor de una isoenzima y además inductor de otra isoenzima que oxida otra sustancia

El citocromo P450 monooxigenasa, es una hemoproteína férrica que toma el O₂ molecular para oxidar. Las reacciones atribuidas a este grupo de enzimas son: hidroxilación aromática, hidroxilación alifática, N-desalquilación, O-desalquilación, S-desalquilación, S-oxidación, N-oxidación, desaminación, desulfuración, deshalogenación, azorreducción, nitrorreducción, peroxidación y epoxidación (Foye, 1991).

Existen otras oxidasas, como la flavoproteína-oxidasa (enzima de función mixta (MFO), monooxigenasa (MO) o enzima de Ziegler), que realiza la oxidación de diferentes centros nucleofílicos que contienen nitrógeno y azufre. Por otra parte se encuentran las aldehído-oxidasas y xantina oxidasas, que utilizan el agua en lugar de oxígeno molecular empleado por el citocromo P450 y la enzima de Ziegler. La monoamino oxidasa (MAO) y la diamino oxidasa (DAO), realizan la desaminación oxidante de aminas primarias y diaminas. La primera contiene flavina como grupo prostético y actúa sobre diaminas cuya distancia es mayor a 6 moléculas de C, mientras que la segunda actúa sobre aquellas aminas con una distancia menor a 6 moléculas de C. La alcohol-deshidrogenasa, cataliza la oxidación de alcoholes primarios o secundarios a aldehídos o cetonas y la reacción inversa de reducción. Pequeños cambios estructurales en un fármaco determinan cambios de la enzima que participa en su metabolismo (Centro Panamericano, 1988; Foye, 1991; Avendaño, 1993; Chiapella *et al.*, 2000)

Si bien estas enzimas contribuyen a la inactivación de compuestos tóxicos, pueden tener un efecto opuesto en el metabolismo xenobiótico, que se manifiesta por la activación de compuestos promutágenos a genotóxicos (Brattsten, 1979 y Feyereisen, 1993 citados en Saner *et al.*, 1996). La mayor concentración y la actividad de estas enzimas se localiza en el hígado, sin embargo, se ha demostrado la actividad de éstas también 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)

2.4. Tintes para cabello

El uso de los tintes sintéticos para colorear el cabello humano data de 1883 cuando Monnet patentó el proceso de aplicar una mezcla fresca de una solución de *p*-fenilendiamina y peróxido de hidrógeno. Este proceso forma la base de los llamados colorantes permanentes muy usados en la actualidad (Burnett, 1987).

Los sistemas modernos del teñido se pueden dividir en tres categorías: temporal, semipermanente y permanente, caracterizadas por el tipo de pigmento empleado, el método de aplicación, la permanencia y el color resultante (Burnett, 1987 y Shipp, 1992).

Los tintes temporales o tintes en enjuague, están elaborados con base en colorantes ácidos del mismo tipo de los usados en la tinción de la lana. Tienen un peso molecular extremadamente alto, se depositan en la superficie de la fibra del cabello y no penetran en la corteza. Están compuestos por una mezcla de colorantes en solución acuosa, de tal forma que el color es removido durante la primera ducha (Burnett, 1987 y Shipp, 1992).

Los tintes semi-permanentes pueden durar de 5 a 6 lavados. No requieren de peróxido de hidrógeno. Usan colorantes de bajo peso molecular que son capaces de penetrar en la corteza del cabello. Están compuestos por una mezcla de colorantes, principalmente nitro-fenilendiaminas, nitro-amino-fenoles, amino-antraquinonas y menos frecuentemente azobencenos (Burnett, 1987 y Shipp, 1992)

En los tintes permanentes, que son los más utilizados, el colorante no está presente como tal en la solución antes de la aplicación, sino que, se forma durante el proceso de teñido y es adherido a la fibra del cabello por oxidación. De aquí que se les conozca también como tintes de oxidación. Se requieren tres clases de reactivos químicos para este efecto: el intermediario primario (IP), el agente acoplador o modificador y un agente oxidante (generalmente peróxido de hidrógeno). En general, las mezclas comerciales constan de dos partes: una solución intermediaria o crema colorante, que consta del IP y los acopladores o modificadores, y otra con el agente



oxidante o crema reveladora. Cuando ambas partes son mezcladas, el IP es gradualmente oxidado y entonces se puede realizar una reacción de acoplamiento con el modificador (Burnett, 1987 y Shipp, 1992)

Los IP son pequeñas moléculas que pueden degradarse y penetrar al cabello, particularmente bajo las condiciones alcalinas que se dan durante la aplicación. Generalmente son compuestos aromáticos con dos grupos donadores de electrones en posición 1,2 ó 1,4. Las combinaciones más efectivas son dos grupos amino o un grupo amino con uno hidroxilo, unidos a un anillo benceno o tolueno. También se les conoce como colorantes *para*, pues entre los más comúnmente usados están la *p*-fenilendiamina, la *p*-toluendiamina y el *p*-aminofenol, que son capaces de ser oxidados por el peróxido de hidrógeno originando benzoquinona iminas. Las iminas reaccionan rápidamente con el acoplador y/o un colorante *para* no oxidado que produce pigmentos indol. La subsecuente oxidación y acoplamiento forman moléculas mucho más grandes, que son "atrapadas" por el cabello, dando el efecto de permanente (Burnett, 1987 y Shipp, 1992).

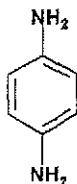
Los agentes modificadores o acopladores pueden estar basados en un anillo de benceno, sistemas de anillos múltiples o anillos heterocíclicos. Requieren la sustitución de grupos en posición 1,3. No son fáciles de oxidar pero lo pueden hacer al acoplarse con la quinona imina formada al oxidar al IP (Burnett, 1987 y Shipp, 1992)

Puede ocurrir más de un estado de acoplamiento, después de la oxidación, las reacciones posibles son numerosas, el cabello mismo puede modificar o tomar parte en las reacciones, por lo que se pueden producir colores no esperados. Anteriormente se creía que el colorante era producido en la fibra del cabello por oxidación de los colorantes intermediarios (teoría de Brandowski) (Burnett, 1987). Ahora se considera que la oxidación y el acoplamiento tienen lugar simultáneamente en la solución fuera del cabello (Shipp, 1992)

La función del peróxido de hidrógeno es completar y controlar la oxidación, así como blanquear el cabello. Para que se lleven a cabo estas reacciones se requiere un pH alto (9.6) y éste se obtiene con el amonio. Algunos de los intermediarios y modificadores son rápidamente oxidados en solución alcalina, por esta razón se les agrega a las mezclas agentes reductores solubles en el agua, como sulfitos, bisulfitos, ditionitos o ácido ascórbico adheridos a la base. Esta última es, normalmente, un jabón con olcato de amonio y una pequeña cantidad de detergente (Burnett, 1987

y Shipp, 1992).

2.4.1. *p*-Fenilendiamina (PFD)



***p*-FENILENDIAMINA**

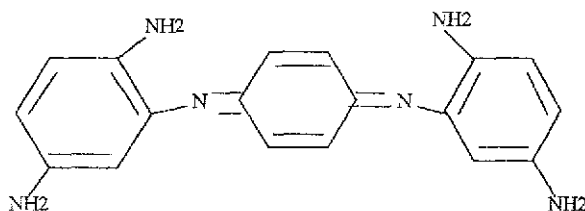
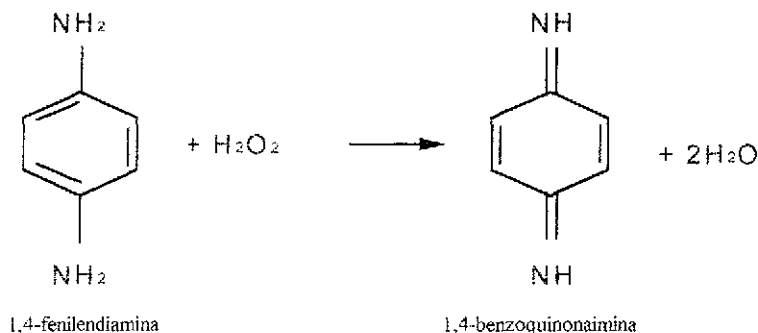
También conocida como 1,4-fenilendiamina, 1,4-bencendiamina o *p*-diaminobenceno ($C_6H_8N_2$; P.M. 108.1) es una amina aromática frecuentemente utilizada como intermediario primario en los tintes permanentes para cabello, generando diversos tonos (Tabla 2.4.1). Se puede reducir en 1,4-nitroanilina con Fe y HCl y oxidar en 1,4-benzoquinonaimina o en diaminofenacina con H_2O_2 (Fig. 2.4.1). Se presenta como cristales blancos, ligeramente rojos, que se oscurecen al exponerse al aire. Soluble en 100 partes de agua fría, alcohol, cloroformo y éter. Se revela en un color negro con peróxido de hidrógeno al 3 %, y en color café con una solución de $FeCl_3$ al 5 %. La dosis letal media en conejos es 250 mg/ kg (The Merck Index, 1995).

Muchos de los colorantes azo, utilizados en la industria, al ser reducidos por el ambiente o por los microorganismos intestinales producen PFD (Chung *et al.*, 1992, 1993).

Tabla 2.4.1. Colores producidos por la *p*-fenilendiamina en presencia de varios acopladores (Tomado de Burnett, 1987).

Acoplador	Color en el cabello
<i>m</i> -fenilendiamina	Púrpura azulado
<i>m</i> -aminofenol	Café claro
4-metil-aminofenol	Café claro
<i>m</i> -metoxifenol	Magenta
6-metil-3-aminofenol	Magenta
2,5-xilenol	Púrpura azulado
Resorcinol	Café verdoso
Hidroquinona	Café grisáceo claro
Catecol	Café grisáceo
Ninguno	Café oscuro

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

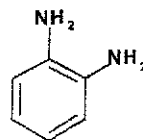


Base Brandowski

Fig. 2.4.1. Dos posibilidades de reacción al oxidar la *p*-fenilendiamina con peróxido de hidrógeno. En el primer caso se forma la 1,4-benzoquinonaimina y en el segundo se forma la base Brandowski, que es una diaminofenacina (Kiese, 1968 y Shipp, 1992).

2.4.2. *o*-Fenilendiamina (OFD)

La *o*-fenilendiamina, también conocida como 1,2-fenilendiamina, 1,2-bencendiamina u *o*-diaminobenceno ($C_6H_8N_2$; P.M. 108 1). Isómero de la *p*-fenilendiamina, intermediario primario en los tintes permanentes de color negro, se ha retirado de algunas mezclas comerciales, debido a su genotoxicidad (L'Oréal de México, com. per.) Es frecuentemente utilizada en ensayos inmunológicos, como revelador. Puede ser reducida en *o*-nitroanilina, con Zn y NaOH y oxidada en 1,2-benzoquinonaimina ó en 2-

***o*-FENILENDIAMINA**

3-diaminofenacina con H_2O_2 . Forma cristales amarillos, es poco soluble en agua y libremente soluble en alcohol, cloroformo y éter. La LD_{50} en ratas es de 600 mg/ kg (Spector, 1965 en: The Merck Index, 1995).

2.5. *Drosophila melanogaster*

Desde 1910 en que T.H. Morgan y sus colaboradores Bridges, Sturtevant y Müller la eligieron como modelo, la mosca del vinagre ha sido un organismo de investigación prominente para los genetistas y biólogos del desarrollo. Al ser un organismo eucarioto y pluricelular, este insecto díptero es un excelente modelo en Toxicología Genética. Presenta pocos cromosomas, sólo cuatro pares, claramente distintos unos de otros por su forma y tamaño. Se conoce todo su genoma. Presenta genes implicados en el metabolismo de xenobióticos y en la reparación de daños al ADN, similares a los de los humanos (Friedberg *et al.*, 1995 y Russell, 1998). No existe normalmente recombinación meiótica en los machos y se pueden obtener balanceadores en los cromosomas que impiden recuperar organismos no deseables por recombinación meiótica (Saner, 1996). Actualmente se puede disponer de líneas especialmente construidas, con marcadores genéticos específicos, para investigar *in vivo* el efecto de tratamientos diversos sobre los genes en células germinales o somáticas (Tabla 2.5.1). No se requiere de grandes inversiones para su mantenimiento, ya que es fácil de ser criado en grandes cantidades en poco espacio y gracias a que se obtiene un gran número de organismos por generación, se puede realizar un análisis estadístico confiable.

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 el efecto de posibles compuestos genotóxicos en dosis crónicas, agudas y fraccionadas de manera controlada. Su ciclo de vida inicia con la oviposición, 24 horas después los huevos sufren eclosión y surgen las larvas que pasan por tres estadios, antes de pasar a prepupa, pupa y adulto (Figura 2.5.1). Después de que emergen las moscas, los machos son fértiles, en aproximadamente 6 a 8 horas, mientras que las hembras tardan de 10 a 12 horas. Durante la fase de larva la ingestión de alimento es continua,

llegando a consumir de tres a cinco veces su peso, incrementándolo de 0.05 a 2.0 mg (Mitchell y Combes, 1984).

Tabla 2.5.1. Bioensayos a corto plazo en *Drosophila melanogaster* (Tomado de Vogel *et al.*, 1999).

Ensayo genético	Núm. de generaciones	Tipos de daños al ADN
Pruebas con células germinales masculinas		
Letales recesivos ligados al sexo	2	Sustitución de bases, corrimiento de marco de lectura, deleciones, pequeñas aberraciones
Letales recesivos autosómicos	3	Sustitución de bases, corrimiento de marco de lectura, deleciones, pequeñas aberraciones
Mutaciones visibles de loci selectos	1-2	Sustitución de bases, corrimiento de marco de lectura, deleciones, pequeñas aberraciones (análisis molecular)
Translocaciones heredables	2	Aberraciones cromosómicas recíprocas
Aberraciones cromosómicas; pérdida de anillos X, cromosomas barra X ó Y	1	Aberraciones cromosómicas, intercambio de cromátidas hermanas
Letales dominantes	1	Aberraciones cromosómicas letales
Aneuploidias	1	Aberraciones cromosómicas, no-disyunción
Pruebas con células somáticas		
Pérdida de heterocigosis debido a recombinación y a eventos mutacionales.	1	Recombinación intracromosómica homóloga, deleción, aberración cromosómica, no-disyunción, mutación
Mutación somática, inserción o pérdida de fragmentos de ADN	1	Mutación, aberración cromosómica, recombinación.
Reparación de ADN	1	DNA dañado procesado por reparación por escisión y/ o postreplicativa

Las larvas de *D. melanogaster* tienen dos linajes celulares: larval e imagal (discos imagales), el primero está implicado exclusivamente en el crecimiento y en la fisiología de la

larva, el segundo, son bolsas epiteliales que permanecen indiferenciadas durante el estadio embrionario. En la metamorfosis, los discos se invaginan y diferencian para formar las estructuras particulares del cuerpo del adulto, como antenas, ojos, halterios, genitales externos, etc. (Russell, 1998)(Figura 2.5.2). Desde el punto de vista genético, los discos imagales constituyen un excelente material de estudio. Cada disco, aparece como primordio desde el primer estadio larval y consiste de 25 a 50 células. A partir de ese momento, el número de células por cada disco se incrementa por mitosis hasta el final de la fase de larva, en la que llega a tener miles de células por disco. Al final del tercer estadio larvario se inicia el periodo de pupa, en el que parte del material larval degenera, las células indiferenciadas forman tejidos y las estructuras del adulto que se derivan de cada disco imagal. De tal manera que, si ocurriera 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 (Mitchell y Combes, 1984).

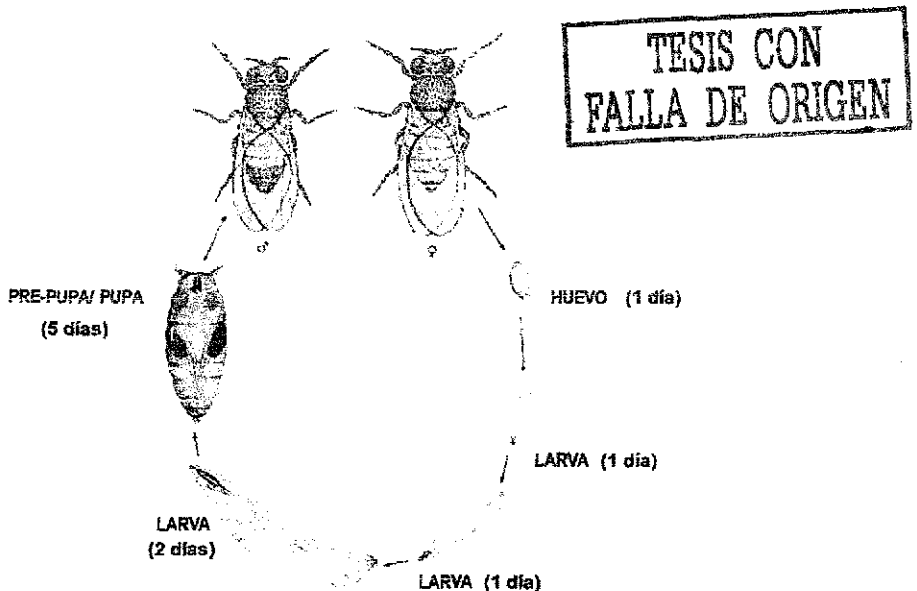


Fig. 2.5.1. Ciclo de vida de *D. melanogaster*

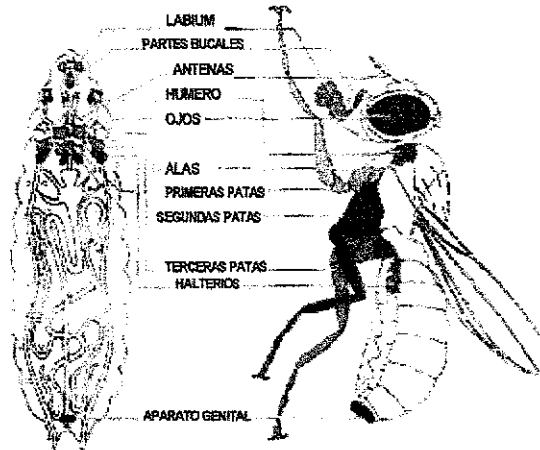


Fig. 2.5.2. Distribución de los discos imagales en la larva de *Drosophila melanogaster* (Lawrence, 1992).

2.6. Prueba de Mutación y Recombinación Somáticas (SMART)

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Uno de los bioensayos a corto plazo que ha dado grandes resultados es la SMART, que detecta mutaciones puntuales, aneuploidías y recombinaciones mitóticas provocadas por la exposición a distintas dosis de algún agente químico o físico, utilizando como modelo experimental a *Drosophila melanogaster* (Guzmán-Rincón y Graf, 1995).

La prueba SMART, emplea 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 heterocigosis de genes marcadores en las células de los discos imagales de las larvas. Al exponer a las larvas portadoras de los marcadores, a un agente sospechoso, el daño se expresará como clones o manchas de células mutantes en las alas o en los ojos de los organismos adultos, estas últimas se pueden observar y contabilizar con ayuda del microscopio óptico y analizar por medio de métodos estadísticos, comparando el tipo y frecuencia de manchas en los tejidos correspondientes con la obtenida en organismos no expuestos (Guzmán-Rincón y Graf, 1995).

La prueba SMART en el ala, ha demostrado ser eficaz al confirmarse con más de 400 agentes físicos y químicos, puros y en mezclas (Guzmán-Rincón y Graf, 1995; Graf *et al.*, 1996 y Vogel *et al.*, 1999), y con un estudio epidemiológico sobre el posible riesgo de padecer cáncer de mama y el uso de antidepresivos tricíclicos, en el que se demostró que los resultados obtenidos con SMART, años antes, concordaban con los de dicho estudio (Sharpe *et al.*, 2002). La prueba requiere una sola generación para obtener resultados y presenta un sistema de activación (*in vivo*) para la detección de procancerígenos o promutágenos, además de ser uno de los tres sistemas eucarióticos, *in vivo*, que pueden medir de manera cuantitativa la recombinación mitótica (Spanó *et al.*, 2001) Tiene la posibilidad de exponer a gran número de células mitóticas, en los discos imagales de la larva, que darán origen a una cantidad mayor de células en estado adulto, por lo que este ensayo permite analizar aproximadamente 25,000 células por ala, al revisar una sola mosca (Graf *et al.*, 1984). Las alas 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 esta 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 (Demerec, 1965; García-Bellido y Merriam, 1971; García-Bellido y Dapena, 1974; Graf *et al.*, 1984).

2.6.1. Líneas y Marcadores

En esta prueba, se utilizan tres líneas, “multiple wing hair” (*mwh/ mwh*), “flare” (*flr³/ In(3LR)TM3, ri p^o sep bx^{34e} e⁺ Bd⁶*; de forma abreviada: *flr³/ TM3, Bd⁶*) y “Oregon flare” (*ORR(1); ORR(2), flr³/ TM3, Bd⁶*) con los siguientes marcadores:

- *mwh* (multiple wing hairs): Mutación recesiva localizada en el brazo izquierdo del cromosoma 3 (3-0.3). Su expresión fenotípica se observa como un cambio en el número de tricomas por célula (2-5).

- *flr³* (flare): Es una mutación recesiva que se expresa como tricomas mal formados y cortos,

con apariencia de flama o roseta de maíz. Está localizada en el brazo izquierdo del cromosoma 3 pero en una posición más próxima al centrómero que la del anterior (3-38.8) (Ramos *et al.*, 1993). Se conocen tres alelos para este locus, todos letales en condición homocigótica. 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).

Bd^f (Beaded-Serratia): Este alelo del locus *Beaded* fue originalmente llamado *Serratia* (*Ser*), se identifica porque las moscas que lo poseen presentan muescas en el borde de las alas. Este marcador dominante se utiliza para reconocer a las líneas *flare* y *Oregon flare*, en condición homocigótica también es letal. Se localiza en el cromosoma 3 (3-92.5) (Osaba *et al.*, 1999).

In(3LR)TM3 (Inversión (3 left, right) Third Multiple 3): Como los marcadores *flr³* y *Bd^f* son letales en homocigosis, las líneas *flare* y *Oregon flare* presentan un cromosoma balanceador con tres inversiones, dos paracéntricas (L y R) y una pericéntrica (L + R), que impiden recuperar eventos no deseables, producto de la recombinación meiótica y permiten mantener las líneas con los marcadores letales en heterocigosis (Graf *et al.*, 1996).

OR(R) ("Oregon resistant"): La línea *Oregon flare* fue construida por Frölich y Würigler en 1989. Esta línea presenta los cromosomas 1 y 2 de la línea *Oregon R(R)* resistente al DDT. El cromosoma 2 acarrea la mutación dominante *Rst(2)DDT* localizada en la región 43E, (2-65), que provoca la expresión constitutiva de una proteína inductora de los genes *Cyp* (*Cyp6a8* y *Cyp6a9* del cromosoma 1 y *Cyp6a2* del cromosoma 2). Los genes *Cyp* se expresan en las enzimas del complejo enzimático citocromo P450. Esta mutación confiere en consecuencia, no sólo resistencia al DDT e insecticidas organofosforados en larvas y adultos, sino también el incremento general en el metabolismo xenobiótico, permitiendo valorar la activación, *in vivo*, de promutágenos (Lindsley y Zimm, 1992; Dapkus y Morell, 1977 y Hålstrom y Blanck, 1985 citados en Delgado-Rodriguez, *et al.*, 1995).

2.6.2. Cruzas

Para realizar esta prueba se proponen dos tipos de cruzas; estándar (Graf *et al.*, 1989) con niveles regulados del citocromo P450 y de bioactivación elevada (Graf y van Schaick, 1992), con

altos niveles constitutivos de esta enzima. Aunque ambos tipos de cruzas son capaces de detectar genotoxinas directas e indirectas, la cruza de bioactivación elevada es más sensible para identificar un gran número de promutágenos y procancerígenos. En ambos tipos de cruzas se utilizan moscas que portan diversas mutaciones recesivas:

Cruza estándar: hembras vírgenes de la línea "flare": $flr^3 / TM3, Bd^{\delta}$ X machos de la línea "multiple wing hairs": mwh / mwh .

Cruza de bioactivación elevada: hembras vírgenes de la línea "Oregon flare": $(ORR(1); ORR(2)); flr^3 / TM3, Bd^{\delta}$ X machos mwh / mwh .

Las larvas producto de estas cruzas tienen genotipo $mwh\ flr^{3+} / mwh^{-}\ flr^3$ o $mwh\ flr^{3+} / TM3, Bd^{\delta}$, y $ORR(1) / +; ORR(2) / +; mwh\ flr^{3+} / mwh^{-}\ flr^3$ u $ORR(1) / +, ORR(2) / +; mwh\ flr^{3+} / TM3, Bd^{\delta}$, respectivamente, en teoría, en proporción 1:1 (Figura 2.6.1) Estos tipos de larvas son indistinguibles, pero al recuperar a los adultos, las larvas transheterocigotas generan moscas con alas de fenotipo silvestre y aquellas que contienen el cromosoma balanceador, moscas con alas serrata (Bd^{δ})

gametos:	σ	Genotipo	Fenotipo
♀	mwh, flr^{3+}		
mwh^+, flr^3	$mwh, flr^{3+} / mwh^+, flr^3$	transheterocigoto	silvestre
$TM3, Bd^{\delta}$	$mwh, flr^{3+} / TM3, Bd^{\delta}$	heterocigoto para mwh , homocigoto para flr^{3+}	alas tipo serrata
$*ORR(1); ORR(2); mwh^+, flr^3$	$ORR(1) / +; ORR(2) / +, mwh, flr^{3+} / mwh^+, flr^3$	transheterocigoto	silvestre, con altos niveles constitutivos del citocromo P450
$*ORR(1); ORR(2); TM3, Bd^{\delta}$	$ORR(1) / +; ORR(2) / +; mwh, flr^{3+} / TM3, Bd^{\delta}$	heterocigoto para mwh , homocigoto para flr^{3+}	alas tipo serrata, con altos niveles constitutivos del citocromo P450

Fig. 2.6.1. Fenotipos y genotipos recuperados en la F1 de las cruzas Estándar y de Bioactivación Elevada (*).

2.6.3. Información generada y poder de resolución

Con esta prueba, se pueden usar tratamientos combinados, pretratamientos o cotratamientos con sustancias sinérgicas o con supuestos antimutágenos (Graf, comunicación personal). Los tratamientos agudos constan de 2 a 6 horas de exposición en los estadios larvales 2° ó 3°. Los tratamientos crónicos pueden iniciarse a las 24, 48 y 96 horas de vida, coincidiendo con las diferentes etapas larvales, lo que significaría que las larvas pueden consumir el xenobiótico durante 96, 72 y 48 horas, respectivamente; estos tiempos son teóricos ya que un efecto tóxico del compuesto puede manifestarse como un retardo en el desarrollo o generar que la larva entre prematuramente en estado de pupa, lo que modifica los tiempos de alimentación (Graf *et al.*, 1984).

Las diferentes clases de manchas registradas en las larvas transheterocigotas pueden deberse a varios tipos de mutación: mutación puntual (Figura 2.6.2e), delección (Figura 2.6.2c), no-disyunción (aneuploidía) (Figura 2.6.2f) así como a recombinación mitótica (Figura 2.6.2b y d) Como resultado de eventos de recombinación, pueden recobrase manchas simples o gemelas, este último evento, producto de la recombinación en el intervalo próximo al centrómero que es acotado por el marcador *flr³* (Fig. 2.6.2b); mientras que las manchas simples *mwh* indican recombinación entre *mwh* y *flr³* (Fig. 2.6.2d) Por otra parte, pueden obtenerse manchas simples *flare* ó *mwh* por eventos como mutación puntual, pérdida parcial o total del cromosoma 3 y no-disyunción (Graf *et al.*, 1984).

El análisis de los dos fenotipos de moscas genera información diversa. La lectura de las alas con genotipo *mwh flr³/ mwh⁺ flr³*, permite observar los tres fenotipos de manchas: Simples *mwh*, simples *flr³* y gemelas (Fig. 2.6.3) En las alas de las moscas que heredaron el cromosoma balanceador, fenotipo *serratia*, no se puede presentar la recombinación, por lo que todas las manchas que se recuperen serán producto de mutaciones y de fenotipo *mwh* Lo anteriormente expuesto permite determinar cuantitativamente la actividad recombinogénica de las genotoxinas, al comparar la frecuencia de manchas simples *mwh* en alas de moscas *Beaded-Serratia*, con la obtenida en las alas de moscas de fenotipo silvestre (Graf y van Schaik, 1992; Delgado-Rodríguez *et al.*, 1994 y Graf y Würigler, 1996).

1 célula mitosis 2 células clones resultantes

1 célula mitosis 2 células clones resultantes

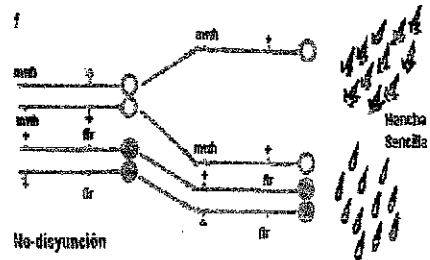
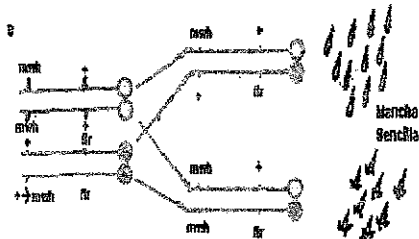
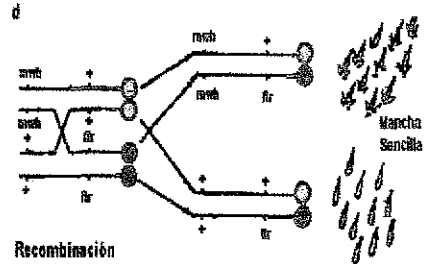
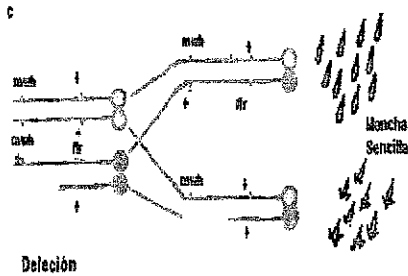
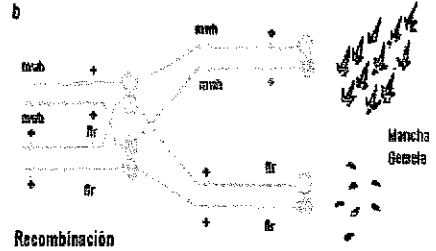
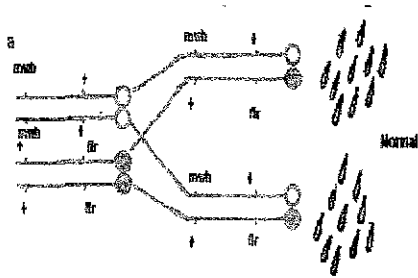


Fig. 2.6.2. Eventos que conducen a la pérdida de heterocigosis, en la prueba del ala SMART. a) Normal, se mantiene la heterocigosis; b) recombinación mitótica en el intervalo próximo al centrómero que es acotado por el marcador *flr*⁺, se producen clones gemelos; c) delección, se pueden obtener clones sencillos *mvh* (ó *flr*, no ilustrado); d) recombinación mitótica entre *mvh* y *flr*⁺, que genera clones sencillos *mvh*; e) mutación puntual y f) no-disyunción (aneuploidía), que pueden producir clones sencillos *mvh* (ó *flr*, no ilustrado) (Tomado de Graf *et al.*, 1984).

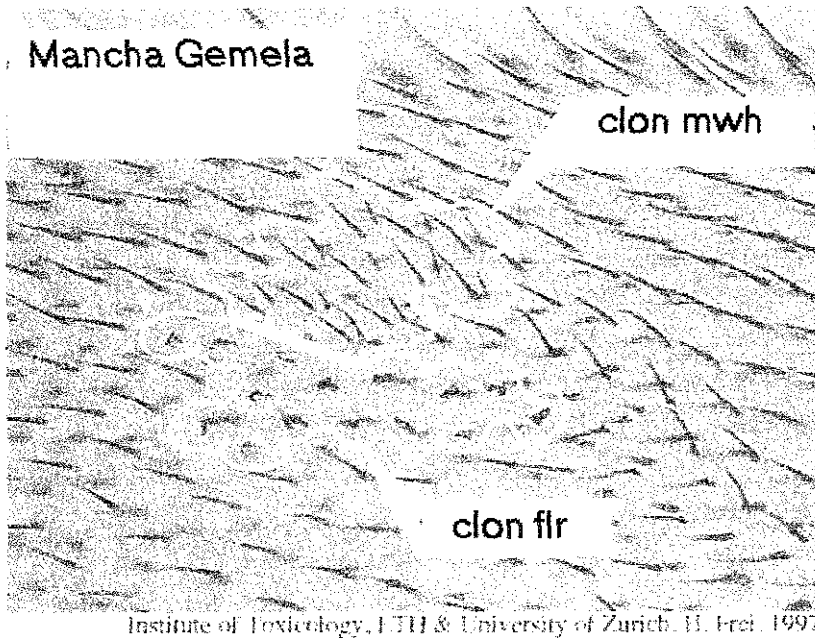


Fig. 2.6.3. Mancha gemela (clones *mwh* y *flr* adyacentes). Este fenotipo se observa cuando se da recombinación mitótica en el intervalo próximo al centrómero que es acotado por el marcador *flr*.

El tamaño de las manchas recobradas refleja el número de divisiones celulares que ocurrieron después de la inducción del cambio genético en la célula afectada original, por lo que puede ser indicador indirecto de la actividad del compuesto y de la velocidad con que alcanza la célula blanco. También puede indicar si existe algún problema con la mitosis o si ocurrió muerte celular, en estos casos el tamaño de las manchas registradas serían menores a lo esperado (Graf *et al.*, 1984) Para el análisis estadístico se asume que todas las células se dividen al mismo ritmo, por lo que el tamaño de la mancha debe corresponder a un número de divisiones (n) que va de 2^0 a 2^n células. Por esta razón las clases de tamaño se agrupan como sigue: 1, 2, 3-4, 5-8, 9-16, 17-32 células, etc. (Graf *et al.*, 1984).

3. ANTECEDENTES

3.1. Toxicidad y teratogénesis de los tintes para cabello

Existen reportes de la toxicidad sistémica de los tintes para cabello administrados por vía oral en suicidios, intentos de suicidio, ingestiones accidentales y homicidios, en donde se ha presentado anorexia, necrosis del músculo estriado y grave deficiencia renal; atrofia óptica, edema oro-faríngeo severo, conducción neural, parálisis y paratesia; entre otros síntomas (Bourquia *et al* , 1988; Sir Hashim *et al* , 1992; Lifshits *et al* , 1993; Ashraf *et al* , 1994; Yagi *et al* , 1996; Sood *et al* , 1996 y Lahbabi *et al* , 1998).

En bioensayos de lapsos cortos se ha descrito que los tintes para cabello presentan efecto bactericida en *Salmonella* (Watanabe *et al* , 1990) y que las *o*- y *p*-fenilendiaminas (OFD y PFD) inhiben la proliferación celular en cultivos de células de ovario de criceto (“hámster”) Chino (CHO-K1) (Chung *et al* , 1995) y en cultivo de linfocitos humanos (Cebulska-Wasilewska *et al* , 1998). Se reporta también que la PFD induce estrés oxidante en cultivos de queratinocitos humanos (Picardo *et al* , 1996) y en hepatocitos humanos (Sood *et al* , 1997).

Existen algunos trabajos epidemiológicos donde se sugiere cierto efecto teratogénico de los tintes para cabello, que indican abortos espontáneos, hijos con retraso mental o con malformaciones cardíacas, entre aquellas mujeres que durante su embarazo estuvieron en contacto laboral o como usuarias de éstos (Roeleveld *et al* , 1993; John *et al* , 1994; Wilson *et al* , 1998). Con respecto a los estudios experimentales, Wernick *et al* en 1975 e Inouye y Murakami en 1977, encontraron malformaciones en el esqueleto de fetos, al aplicarles 2,5-diaminotolueno dihidrocloride (*p*-toluendiamida), a ratas y ratones preñados, respectivamente. Sin embargo, Burnett *et al* en 1976, no encontraron efecto teratogénico al aplicar tintes semipermanentes y permanentes a ratas y conejos.

3.2. Penetración por piel de los componentes de los tintes para cabello

Burnett en 1987 menciona que durante la aplicación normal de los tintes para cabello, el producto permanece en la cabeza de 20 a 60 minutos y cerca del 90 % del compuesto es eliminado

durante el champú que es realizado inmediatamente después, por lo que la penetración del tinte a través del cuero cabelludo tendría que producirse durante ese lapso, después sería muy difícil, ya que en las raíces del cabello, que están en contacto con la piel, no penetra el color. Dice también que los reportes de personas que después de aplicarse algún tinte, eliminan por orina componentes de éstos, son muy limitados y difíciles de confirmar. Sin embargo, existen trabajos (Sardas *et al.*, 1997) que proponen que estos compuestos realmente penetran por la piel de humanos y algunas veces han sido detectados en la orina de la gente que se ha teñido el cabello bajo condiciones normales de uso (Marshall y Palmer, 1973 y Peter, 1975). Existen también diseños experimentales que demuestran la penetración de algunos componentes de los tintes, después de la aplicación tópica de mezclas comerciales o compuestos puros, oxidados o sin oxidar, realizados *in vivo* en ratones y conejos (Stenbäck *et al.*, 1977); perros (Kiese *et al.*, 1968 y Hurby, 1977); ratas (Hurby, 1977; Burnett, 1978 y Beck *et al.*, 1993); monos *rhesus* (Maiback y Wolfram, 1981; Burnett, 1987 y Sardas *et al.*, 1997) y humanos (Kiese *et al.*, 1968 y Maiback y Wolfram 1981).

En estos trabajos se reporta que algunos de los componentes de los tintes se presentan en orina o heces, en proporciones que van del 1 al 5 %, cuando se aplicaron con agua y del 0.01 al 0.3 % cuando se aplicaron con peróxido de hidrógeno. Stenbäck *et al.* en 1977, llegaron a la conclusión de que las aminas aromáticas y algunos bencenos son fácilmente absorbidos, calculando que alrededor de 4 a 6 mg del tinte es absorbido por el cuero cabelludo durante el proceso de aplicación *in vivo*. Se menciona también la presencia de estos componentes en sangre (Hurby, 1977 y Burnett, 1978) y en glándula tiroides (Burnett, 1978). En este último trabajo, Burnett, descubrió que, cuando el tinte se aplica tópicamente, el 7 % permanece en cuero cabelludo un mes después de la aplicación y añade que si se suman la cantidad de compuesto colectado en orina, heces y la que permanece en el cadáver del animal, después de 7 días, hay una absorción del 1.6 al 2 %.

3.3. Antecedentes epidemiológicos

Estudios epidemiológicos realizados en las últimas décadas han indicado que aquellas personas (mujeres u hombres) que tiñen su cabello frecuentemente con tintes permanentes, semi-

permanentes o temporales, o aquéllas que tienen exposición laboral a éstos, posiblemente tiene más riesgo de contraer ciertos tipos de cáncer. Se ha encontrado una asociación estadísticamente significativa entre dosis y respuesta. En donde la dosis está determinada por la frecuencia de uso, la cantidad de tinte usado en cada aplicación y el período total en que se ha estado aplicando. Otro factor que se ha evaluado en estos estudios, es el tipo de tinte y color utilizados, de tal manera que se presenta mayor riesgo asociado con los tintes permanentes que el asociado a tintes semi-permanentes o temporales. Se ha reportado también que en las mujeres que usan colores negro, castaño o rojo, se incrementa 2 ó 4 veces el peligro de tener un diagnóstico con algunos tipos de cáncer, que en aquéllas que usaron colores claros. En ciertos casos la asociación se ha restringido a alguno de los sexos, a un color, al tiempo de uso o incluso sólo cuando estaba asociado a otro factor, como el hábito de fumar. Sin embargo, en algunos otros estudios no se encontró ningún tipo de asociación tintes-cáncer. En la tabla 3.3.1 se presenta un resumen de estos hallazgos.

3.4. Antecedentes experimentales

La posible toxicidad crónica, la capacidad de inducir mutaciones y el potencial cancerígeno de las mezclas comerciales, o fórmulas prototipo, de tintes permanentes y semi-permanentes; así como de sus componentes purificados, han sido probados por varios investigadores en bioensayos con mamíferos, bacterias, cultivos de células, etc. Estos estudios se iniciaron en 1966 (Burnett, 1987) involucrando diversas pruebas, entre las cuales figuran la administración del tinte en animales de laboratorio, por vía oral, cutánea o inyectado, así como bioensayos de lapsos cortos *in vivo* o *in vitro*.

3.4.1 Mezclas comerciales y fórmulas prototipo

Una gran cantidad de tintes para cabello y algunas de sus aminas resultaron positivos en ensayos de mutagénesis, sin embargo no mostraron una actividad cancerígena clara en bioensayos con animales. Ames *et al.* en 1975 con la prueba de *Salmonella typhimurium* reportaron que el 89 % de las mezclas comerciales estudiadas por su grupo resultaron positivas. Albano *et al.*, 1982; Zito, 1982; Watanabe *et al.*, 1990 y Ferguson *et al.*, 1990 también encontraron resultados positivos

Tabla 3.3.1. Estudios epidemiológicos que presentan o no, relación estadísticamente significativa, entre el uso o contacto laboral de los tintes para cabello y el riesgo de contraer algún tipo de cáncer.

	Incremento estadísticamente significativo en el riesgo	Sin asociación estadísticamente significativa
Cáncer de vejiga y tracto urinario bajo.	Najem <i>et al.</i> , 1982. Asociado al hábito de fumar Skov <i>et al.</i> , 1990. Sólo en estilistas varones Skov y Lyngé en 1994 La-Vecchia y Javani en 1995	Howe <i>et al.</i> , 1980 Sullivan, 1982 Nomura <i>et al.</i> , 1989 Thun <i>et al.</i> , 1994
Cáncer de las células de la médula ósea o mieloma múltiple	Zahm <i>et al.</i> , 1992 Brown <i>et al.</i> , 1992 Thun <i>et al.</i> , 1994. Sólo en mujeres que usaron tintes negros durante más de 20 años Burmaister <i>et al.</i> , 1994 Herrinton <i>et al.</i> , 1994 Miligi <i>et al.</i> , 1999	Grodstein <i>et al.</i> , 1994 Colditz <i>et al.</i> , 1994
Cáncer en el sistema linfático o linfoma de no-Hodgkin	Cantor <i>et al.</i> , 1988 Blair <i>et al.</i> , 1992 Zahm <i>et al.</i> , 1992 Pearce y Bethwait, 1992 Boffetta <i>et al.</i> , 1994 Burmaister <i>et al.</i> , 1994 Thun <i>et al.</i> , 1994. Sólo en mujeres que usaron tintes negros durante más de 20 años Skov y Lyngé <i>et al.</i> , 1994 Greiner <i>et al.</i> , 1995 La-Vecchia y Javani, 1995 Holly <i>et al.</i> , 1998 Miligi <i>et al.</i> , 1999	Cote <i>et al.</i> , (1994) Estudio limitado a peluqueros con SIDA Grodstein <i>et al.</i> , 1994 Colditz <i>et al.</i> , 1994 Altekruse <i>et al.</i> , 1999 Correa <i>et al.</i> , 2000
Varios tipos de leucemia, preleucemia y desordenes hematopoyéticos	Cantor <i>et al.</i> , 1988 Zahm <i>et al.</i> , 1992 Sandler <i>et al.</i> , 1993 en: Burmaister <i>et al.</i> , 1994 Burmaister <i>et al.</i> , 1994 Mele <i>et al.</i> , 1994. Sólo para los tonos oscuros Miligi <i>et al.</i> , 1999	Shibata <i>et al.</i> , 1990 Grodstein <i>et al.</i> , 1994 Colditz <i>et al.</i> , 1994
Cáncer de ovarios	Tzonou <i>et al.</i> , 1993 Boffetta <i>et al.</i> , 1994 Burmaister <i>et al.</i> , 1994	SR
Cáncer de glándula salival	Spitz <i>et al.</i> , 1990. Sólo en mujeres	SR
Sarcoma de Kaposi	Hardell <i>et al.</i> , 1987. En hombres con SIDA, ocupacionalmente expuestos	SR
Síndrome mielodisplástico	Nagata <i>et al.</i> , 1999	Ido <i>et al.</i> , 1996 Correa <i>et al.</i> , 2000 Altekruse <i>et al.</i> , 1999
Cáncer de mama	Kinlen <i>et al.</i> , 1977. Sólo en mujeres fumadoras o ex-fumadoras mayores de 50 años Shore <i>et al.</i> , 1979. Sólo en mujeres mayores de 50 años con más de 10 años de uso Koenig <i>et al.</i> , 1991. Sólo estilistas mujeres con más de 5 años trabajando	Stavraky <i>et al.</i> , 1979 Nasca <i>et al.</i> , 1992 Thun <i>et al.</i> , 1994 La-Vecchia y Javani, 1995 Cook <i>et al.</i> , 1999
Cáncer de Wilms	SR	Olshan <i>et al.</i> , 1993
Cáncer del cuello de la matriz y endometrio	SR	Stavraky <i>et al.</i> , 1979 Thun, <i>et al.</i> , 1994
Melanoma cutáneo maligno	SR	Østerlind <i>et al.</i> 1988 La-Vecchia y Javani, 1995

SR = sin referencias.

con el ensayo de *Salmonella*, TA98 en mezclas comerciales de tintes para cabello; en todos los casos, la oxidación y la presencia del activador metabólico de mamífero S9, incrementaron el efecto. Sin embargo, Wang *et al.* (1991) y Sardas *et al.* (1997) obtuvieron datos negativos con las cepas TA98 y TA100, con y sin activación metabólica.

También se mencionan negativos en otras pruebas a corto plazo, como son el ensayo de micronúcleos en médula ósea de ratón (Wang *et al.*, 1991), intercambio de cromátidas hermanas en linfocitos humanos y el ensayo cometa (Sardas *et al.*, 1997)

Para determinar el potencial cancerígeno de los tintes para cabello, se realizaron ensayos con mamíferos como ratones de la línea Swiss Webster (Burnett *et al.*, 1980), o con ratas Sprague-Dawley (Kinkel y Holzmann, 1973; Burnett *et al.*, 1980 y Burnett y Goldenthal, 1988), a los que se les aplicaron mezclas comerciales o mezclas prototipo oxidadas con peróxido de hidrógeno (6%, 1:1), de manera tópica y en los que se describieron resultados negativos

3.4.2 Aminas aromáticas

Las fórmulas permanentes de tintes para cabello son una mezcla de aminas aromáticas, derivados nitroaromáticos y fenoles, los cuales son mezclados con peróxido de hidrógeno justo antes de su aplicación. Por esta razón el Instituto Nacional del Cáncer instituyó en la década de los setenta, un programa para detectar, a través de diversos bioensayos, la seguridad de los agentes químicos utilizados en la elaboración de tintes para cabello. Sin embargo, en ensayos de lapsos cortos, se han encontrado resultados experimentales contradictorios relacionados con el efecto genotóxico de éstos. En particular, las aminas aromáticas OFD y PFD, de interés para este trabajo, se mencionan como no-mutagénicas, debilmente positivas o positivas (Tabla 3.4.1)

Se indica que las aminas nitroaromáticas deben ser activadas metabólicamente para ser genotóxicas. La N-oxidación mediada principalmente por el citocromo P450 y la flavin monooxigenasa es el primer paso en la biotransformación de las aminas aromáticas, aunque éstas puedan ser activadas también por enzimas peroxidadas en los sistemas vegetales (Wild *et al.*, 1980; Rodríguez-Arnaiz y Hernández, 1994; Chiapella *et al.*, 1997, 2000 y Cortés-Eslora *et al.*, en prensa).

Tabla 3.4.1. Se muestran resultados positivos, negativos e incluso aquellos en que se reportan como testigos positivos las aminos OFD y/o PFD, en estudios experimentales de lapsos largos y cortos.

Ensayo	Positivos	Negativos
Potencial cancerígeno <i>in vivo</i> , a largo plazo, en cricetos, ratones, ratas y/o conejos. Aplicación tópica, en la dieta o intraperitoneal	Palmer <i>et al.</i> , 1976 (✓) Rojanapo <i>et al.</i> , 1986 (✓) Sontag, 1981 (✓) Oberly <i>et al.</i> , 1984 (✓)	Burnett <i>et al.</i> , 1975 (✓) Stenback <i>et al.</i> , 1977 (✓) Burnett y Goldenthal, 1988 (✓) Instituto Nacional del Cáncer, 1979 en: Burnett y Goldenthal, 1988 (✓) Kerckaet <i>et al.</i> , 1998. (✓)
Letales dominantes en ratas Charles River	SR	Burnett <i>et al.</i> , 1977 (A)
Cultivo de células de mamíferos, micronucleos en médula ósea, linfocitos humanos <i>in vitro</i> , intercambio de cromátidas hermanas y aberraciones cromosómicas en células de ovario de criceto Chino (CHO-K)	Venitt <i>et al.</i> , 1975 (✓) Kirkland y Venitt, 1976 (✓) Bendict, 1976 (✓) Palmer <i>et al.</i> , 1976 (✓) Wild <i>et al.</i> , 1980 (*) Shelby y Stasiewicz, 1984 (✓) Chung <i>et al.</i> , 1995, 1996. (A) Cebulska-Wasilewska <i>et al.</i> , 1998 (*) (TP)	Soler-Niedziela <i>et al.</i> , 1991(A) Williams <i>et al.</i> , 1982 en: Batiste-Alentorn <i>et al.</i> , 1995 (✓)
Ensayo cometa	Cebulska-Wasilewska <i>et al.</i> , 1998 (*) (TP)	SR
<i>S. typhimurium</i> TA1538, TA98 y TA100 con y sin de S9.	Ames <i>et al.</i> , 1975 (A) Searle <i>et al.</i> , 1975 (A) Venitt y Searle, 1976 (A) Gentile <i>et al.</i> , 1986 (✓) Watanabe <i>et al.</i> , 1989 y 1990 (A), seguido de oxidación con H ₂ O ₂ Chung <i>et al.</i> , 1995, 1996 (A)	Chen <i>et al.</i> , 1997 (✓)
<i>S. typhimurium</i> TA1538, TA98 y TA100 con activación vegetal (AV); <i>Persea americana</i> S117 con alto contenido en P-450	SR	Chiapella <i>et al.</i> , 1997 (A)
<i>S. typhimurium</i> TA1538, TA98 y TA100 con AV; <i>Zea mays</i> S9 con alta actividad peroxidasa	SR	Chiapella <i>et al.</i> , 1997 (A)
<i>Tradescantia</i> 4430	Gichner <i>et al.</i> , 1994 (A) (TP) Chiapella <i>et al.</i> , 1997 (A) Xiao e Ichikawa, 1998 (*) (TP) Gichner y Veleňský en 1999 (*) (TP)	SR
SMART (zeste-white, white-ivory y ensayo del ala), cruza E, recíproca (PFD sin oxidar, 1.0 y 3.0mM)	Batiste-Alentorn <i>et al.</i> , 1995(✓)	SR

(*) = OFD, (✓) = PFD, (A) = ambos, (TP) = testigo positivo, SR = sin referencias

Los colorantes azo, la 2,3-diaminofenacina y la 2-amino-3-hidroxifenacina son productos oxidados de las fenilendiaminas contenidas en los tintes para cabello y están presentes en algunas fórmulas de pesticidas. Estudios anteriores han demostrado que estos compuestos son mutagénicos

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

en *S. typhimurium* después de la activación con la fracción microsomal S9 de mamífero, induciendo mutaciones de corrimiento de marco de lectura ("frameshift"), transiciones y transversiones (Wagner *et al.*, 1996). Los derivados nitro del *p*- y *o*-fenilendiamina, como el 2-nitro-*p*-fenilendiamina, 3-nitro-*o*-fenilendiamina y 4-nitro-*o*-fenilendiamina, se han reportado como mutágenos directos en *S. typhimurium* TA98, TA100, TA104, TA4001 y TA4006 (Shahin, 1994; Chung *et al.*, 1996; Chen *et al.*, 1997) En todos los casos los compuestos son más mutagénicos al ser activados.

En vista de que los resultados de las pruebas epidemiológicas y de genotoxicidad de los compuestos químicos con que se elaboran los tintes para cabello, han mostrado ser contradictorias e inconsistentes y a que millones de hombres y mujeres, usan regularmente tintes, así como, que las aminas *o* y *p*-fenilendiamina (OFD⁴ y PFD) son componentes importantes de los tintes permanentes, se propone el ensayo de una mezcla comercial de tinte para cabello, así como la de los colorantes amino-nitroaromáticos PFD y OFD con la prueba de mutación y recombinación somática en el ala de *D. melanogaster*.

⁴Cabe aclarar que, L'Oréal México retiró de sus fórmulas este compuesto (L'Oréal México, com per 1995).

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo general

Determinar la genotoxicidad de los componentes de un tinte para el cabello, que contiene el colorante *p*-fenilendiamina, mediante la prueba SMART del ala en *Drosophila melanogaster*, cruzas E y de BE.

4.2. Objetivos particulares

1. Evaluar el efecto genotóxico de las *o*-fenilendiamina y *p*-fenilendiamina en *Drosophila melanogaster* por la prueba SMART en ala en cruzas E y de BE.
2. Determinar si el uso del peróxido de hidrógeno influye en la respuesta de SMART de las aminas aromáticas.
3. Aportar nuevos datos que contribuyan a dilucidar la controversia planteada por los diversos autores, con respecto a la actividad genotóxica de los tintes para cabello y sus componentes.

5. HIPÓTESIS

1. Si, de acuerdo con algunos de los antecedentes, las aminas OFD y PFD son promutágenos, entonces se espera encontrar mayor efecto genotóxico en la cruce de BE, que contiene niveles altos de citocromo P450 que en la cruce E, tanto en los compuestos puros, como en la crema colorante que contiene el PFD.

2. Si la oxidación química *in vitro* de las OFD y PFD es prerequisite para mostrar genotoxicidad, entonces se observará mayor efecto genotóxico en la mezcla (crema colorante + crema reveladora) así como en los compuestos puros oxidados con peróxido de hidrógeno

Para comprobar las hipótesis planteadas se propuso el siguiente diseño y la siguiente metodología:

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo general

Determinar la genotoxicidad de los componentes de un tinte para el cabello, que contiene el colorante *p*-fenilendiamina, mediante la prueba SMART del ala en *Drosophila melanogaster*, cruzas E y de BE.

4.2. Objetivos particulares

1. Evaluar el efecto genotóxico de las *o*-fenilendiamina y *p*-fenilendiamina en *Drosophila melanogaster* por la prueba SMART en ala en cruzas E y de BE.
2. Determinar si el uso del peróxido de hidrógeno influye en la respuesta de SMART de las aminas aromáticas.
3. Aportar nuevos datos que contribuyan a dilucidar la controversia planteada por los diversos autores, con respecto a la actividad genotóxica de los tintes para cabello y sus componentes.

5. HIPÓTESIS

1. Si, de acuerdo con algunos de los antecedentes, las aminas OFD y PFD son promutágenos, entonces se espera encontrar mayor efecto genotóxico en la cruce de BE, que contiene niveles altos de citocromo P450 que en la cruce E, tanto en los compuestos puros, como en la crema colorante que contiene el PFD.

2. Si la oxidación química *in vitro* de las OFD y PFD es prerequisite para mostrar genotoxicidad, entonces se observará mayor efecto genotóxico en la mezcla (crema colorante + crema reveladora) así como en los compuestos puros oxidados con peróxido de hidrógeno

Para comprobar las hipótesis planteadas se propuso el siguiente diseño y la siguiente metodología:

6. DISEÑO

Se realizó la prueba SMART en cruzas estándar (E) y de bioactivación elevada (BE), tratamiento crónico 48 horas, en experimentos paralelos con idénticas condiciones.

E: $flr^3/ TM3, Bd^6 \times mwh/mwh$

BE: $ORR(1);ORR(2); flr^3/ TM3, Bd^6 \times mwh/mwh$

El diseño se dividió en dos fases: en la primera se probó una mezcla comercial (crema colorante + crema reveladora) así como sus componentes por separado (crema colorante o crema reveladora) a 0.25, 0.50 y 0.75 % (p/v ó v/v, según el caso) en agua desionizada (Figura 6 1) En la segunda se utilizó la *p*-fenilendiamina a 0.001, 0.1 y 10.0 μ M disuelta en una solución de etanol al 1.2 % (v/v) y la *o*-fenilendiamina a 0.6, 1.0 y 2.0 μ M, disuelta en agua desionizada. En ambas aminas se probaron las mismas dosis mezclándolas con peróxido de hidrógeno al 6 % (v/v) en proporción 1:1 (Figura 6 2).

Fase 1. Mezcla comercial			
	Crema Reveladora (Revelador)	Crema Colorante (Tinte)	Revelador + Tinte (1:0.7)
Cruza Estándar	Testigo agua desionizada	Testigo agua desionizada	Testigo agua desionizada
	0.25 % (v/v)	0.25 % (p/v)	0.25 % (p/v)
	0.50 % (v/v)	0.50 % (p/v)	0.50 % (p/v)
	0.75 % (v/v)	0.75 % (p/v)	0.75 % (p/v)
Cruza de Bioactivación Elevada	Testigo agua desionizada	Testigo agua desionizada	Testigo agua desionizada
	0.25 % (v/v)	0.25 % (p/v)	0.25 % (p/v)
	0.50 % (v/v)	0.50 % (p/v)	0.50 % (p/v)
	0.75 % (v/v)	0.75 % (p/v)	0.75 % (p/v)

Fig. 6.1. Diseño de la fase 1, donde se probó la mezcla comercial L'Oréal Imedia Excellence Castaño No. 4, así como sus componentes, crema colorante y crema reveladora, en tres diferentes concentraciones; de manera simultánea en ambas cruzas, con tres repeticiones por tratamiento y en tres experimentos independientes.

Fase 2. Aminas Aromáticas				
	<i>p</i> -Fenilendiamina		<i>o</i> -Fenilendiamina	
	sin H ₂ O ₂	con H ₂ O ₂ al 6 % (v/v) 1:1	sin H ₂ O ₂	con H ₂ O ₂ al 6 % (v/v) 1:1
Cruza Estándar	Testigo alcohol 1.2 % (v/v)	Testigo alcohol 1.2 % (v/v)	Testigo agua desionizada	Testigo agua desionizada
	0.001 µM	0.001 µM	0.6 µM	0.6 µM
	0.1 µM	0.1 µM	1.0 µM	1.0 µM
	10.0 µM	10.0 µM	2.0 µM	2.0 µM
Cruza de Bioactivación Elevada	Testigo alcohol 1.2 % (v/v)	Testigo alcohol 1.2 % (v/v)	Testigo agua desionizada	Testigo agua desionizada
	0.001 µM	0.001 µM	0.6 µM	0.6 µM
	0.1 µM	0.1 µM	1.0 µM	1.0 µM
	10.0 µM	10.0 µM	2.0 µM	2.0 µM

Fig. 6.2. Diseño de la fase 2, donde se probaron las aminas nitroaromáticas *o*- y *p*-fenilendiamina con y sin oxidación (H₂O₂ al 6% (v/v) 1:1), en tres diferentes concentraciones; de manera simultánea en ambas cruza, con tres repeticiones por tratamiento y en tres experimentos independientes.

Cada experimento se realizó en condiciones similares, las larvas tratadas y los testigos concurrentes se mantuvieron en estufas a 25 °C y 65 % de humedad. Los diferentes compuestos y sus distintas dosis se probaron de manera simultánea en ambas cruza, con tres repeticiones por tratamiento, en tres experimentos independientes. Como testigos negativos se utilizaron: agua desionizada (filtro Thermoline) y etanol al 1.2 % (v/v). El testigo positivo fue uretano (etil carbamato) FLUKA, No. Cat. 94300, Reg No 51-79-6, pureza >99 %, a 20 mM

6.1. Hipótesis estadística

De acuerdo con Frei y Würzler (1995), para determinar el resultado, se emplearon las siguientes hipótesis estadísticas: si se acepta H₀, se asume que el tratamiento experimental no incrementa la frecuencia de la expresión de los marcadores ocurridos de manera espontánea en el testigo; si se rechaza la H₀, se asume *a priori* que al menos un tratamiento determinado incrementa la frecuencia espontánea por un cierto múltiplo (ρ) de la frecuencia obtenida en el testigo. Esta

constante ρ indica cuántas veces debe incrementarse el número de eventos, con respecto al testigo para considerar una respuesta positiva. En este caso, se escogió de manera empírica un factor de multiplicación, $\rho = m$, en el que $m = 2$ para las manchas totales y pequeñas y $m = 5$ para las manchas grandes y gemelas (Frei y Würzler, 1988).

7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1. Fase 1

Se utilizó la mezcla comercial L'Oréal Imedia Excellence Castaño No. 4. Se eligió este tono porque, de acuerdo con las referencias epidemiológicas, es donde se reporta mayor asociación tinte-cáncer. Además de que en este tono se asume la presencia forzosa de la *p*-fenilendiamina y no requiere acoplador para obtener el tono (Tabla 2.4.1).

Se realizó la mezcla de los componentes (crema colorante + crema reveladora) en las proporciones indicadas en el producto comercial, (revelador : colorante 1 : 0.7) y se realizaron diluciones al 0.75, 0.5 y 0.25 % (p/v) con agua desionizada. Se probaron cada uno de sus componentes (crema colorante y crema reveladora) por separado a las mismas cantidades. Éstas fueron determinadas en un estudio preliminar de toxicidad realizado en ambas cruces para la mezcla (crema colorante + crema reveladora), en el que se encontró una sobrevivencia del 0.0 % para las concentraciones mayores del 1 % (p/v) y 45, 65 y 75 %, para las diluciones 0.75, 0.5 y 0.25 % (p/v), respectivamente.

7.2. Fase 2

La *p*-fenilendiamina (PFD) (CAS No. 106-50-3) fue generosamente donada por L'Oréal de México y fue diluida en una solución de alcohol al 1.2 % (v/v) (alcohol absoluto Reptoquifin; reactivo analítico; CAS 64-17-5; Cat 20130; Lote 4572-C). Se preparó una solución patrón (10 mM) que se dividió en dos partes, una de ellas se utilizó para los tratamientos sin oxidar, la otra fue tratada con peróxido de hidrógeno al 6 %, 1:1. Las dosis usadas fueron 0.001, 0.1 y 10.0 μ M para ambas y fueron determinadas en un ensayo preliminar de sobrevivencia en las líneas,

constante ρ indica cuántas veces debe incrementarse el número de eventos, con respecto al testigo para considerar una respuesta positiva. En este caso, se escogió de manera empírica un factor de multiplicación, $\rho = m$, en el que $m = 2$ para las manchas totales y pequeñas y $m = 5$ para las manchas grandes y gemelas (Frei y Würzler, 1988).

7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1. Fase 1

Se utilizó la mezcla comercial L'Oréal Imedia Excellence Castaño No. 4. Se eligió este tono porque, de acuerdo con las referencias epidemiológicas, es donde se reporta mayor asociación tinte-cáncer. Además de que en este tono se asume la presencia forzosa de la *p*-fenilendiamina y no requiere acoplador para obtener el tono (Tabla 2.4.1).

Se realizó la mezcla de los componentes (crema colorante + crema reveladora) en las proporciones indicadas en el producto comercial, (revelador : colorante 1 : 0.7) y se realizaron diluciones al 0.75, 0.5 y 0.25 % (p/v) con agua desionizada. Se probaron cada uno de sus componentes (crema colorante y crema reveladora) por separado a las mismas cantidades. Éstas fueron determinadas en un estudio preliminar de toxicidad realizado en ambas cruces para la mezcla (crema colorante + crema reveladora), en el que se encontró una sobrevivencia del 0.0 % para las concentraciones mayores del 1 % (p/v) y 45, 65 y 75 %, para las diluciones 0.75, 0.5 y 0.25 % (p/v), respectivamente.

7.2. Fase 2

La *p*-fenilendiamina (PFD) (CAS No. 106-50-3) fue generosamente donada por L'Oréal de México y fue diluida en una solución de alcohol al 1.2 % (v/v) (alcohol absoluto Reptoquifin; reactivo analítico; CAS 64-17-5; Cat 20130; Lote 4572-C). Se preparó una solución patrón (10 mM) que se dividió en dos partes, una de ellas se utilizó para los tratamientos sin oxidar, la otra fue tratada con peróxido de hidrógeno al 6 %, 1:1. Las dosis usadas fueron 0.001, 0.1 y 10.0 μ M para ambas y fueron determinadas en un ensayo preliminar de sobrevivencia en las líneas,

partiendo de la dosis sugerida por Burnett *et al.* (1977) que menciona que la exposición mensual tópica de un producto comercial contiene 2 g (40 mg/ kg) o menos en el tinte total. Los cálculos se realizaron tomando en cuenta el peso de las larvas del tercer estadio

La *o*-fenilendiamina OFD⁵ (Fluka Biochemica, CAS: 95-54-5, Reg. 2024306, pureza 99 %) Fue diluida en agua desionizada y al igual que en la PFD la solución patrón fue dividida para obtener las concentraciones oxidadas 1:1 con peróxido de hidrógeno al 6 % (v/ v) y las no-oxidadas. Las dosis usadas fueron 0.6, 1.0 y 2.0 μ M, previamente determinadas, mediante pruebas de sobrevivencia, partiendo de la LD₅₀ descritas para ratas, 600 mg/ kg (Spector, 1965 en: The Merck Index, 1995)

Ambas aminas se oxidaron con el peróxido de hidrógeno al 6 % (v/ v), en proporción 1:1, ya que así es como se aplican en los tintes permanentes (Burnett *et al.*, 1980)

7.3. Material biológico

Se utilizaron las líneas⁵:

mwh (*mwh*/ *mwh*),

flare (*flr*³/ *TM3*, *Bd*[♂]) y

Oregon flare (*ORR*(1); *ORR*(2); *flr*³/ *TM3*, *Bd*[♂])

7.4. Metodología general

Se seleccionaron hembras vírgenes de las líneas *flare* y *Oregon flare* y machos de la línea *mwh*, para realizar las cruzas E y de BE

Se colectaron los huevos de cada una de las cruzas durante 8 h a 25 °C y 65 % de humedad, en frascos que contenían una capa soporte de grenetina al 10 % (p/ v) y una capa superior de levadura fresca.

Se aislaron las larvas, producto de las cruzas E y de BE, de 72 \pm 4 h de vida con agua

⁵ Generosamente donadas por el Dr Ulrich Graf del Institute of Toxicology, Swiss Federal Institute of Technology (ETH) and University of Zurich

corriente a 25 °C en coladera de malla pequeña. Este estadio larval es óptimo para la prueba, ya que se produce elevada proliferación celular, la cantidad de alimento que consumen es mayor y son lo suficientemente maduras como para soportar el tratamiento, además de que es en esta etapa donde, la frecuencia de inducción de clones *mwh* es más alta y al analizar a los adultos, se tiene mayor oportunidad de observar manchas gemelas, indicadoras de recombinación mitótica (Graf, 1995).

Las larvas de 72 ± 4 h se sometieron a un tratamiento crónico (48 h) por triplicado, a tres diferentes cantidades de la mezcla comercial y cada uno de sus componentes, así como de los colorantes puros, oxidados y sin oxidar. En todos los tratamientos se utilizó Medio Instantáneo para *Drosophila* (Formula 4-24, Carolina Biological Supply Co., Burlington, North Carolina 27215; Gladstone, Oregon 97027).

Una vez que los organismos tratados emergieron de la pupa y tenían bien extendidas las alas se fijaron en alcohol al 70 % (v/v).

Posteriormente, se realizaron preparaciones permanentes de las alas, separando éstas del resto del cuerpo con pinzas entomológicas y colocándolas en un portaobjetos con solución de Faure (30 g de goma arábiga, 20 ml de glicerol, 50 g de hidrato de cloral y 50 ml de agua). Las preparaciones se colocaron, protegidas del polvo, en una plancha a 40 °C durante 24 h; después de esto se les añadió 2 gotas de la solución de Faure; y se cubrieron con un cubreobjetos del No 1 colocándoseles encima aproximadamente 300 g de peso, las preparaciones permanecieron en la plancha por 24 h más.

Se analizaron sólo las alas transheterocigotas (tanto la superficie dorsal como la ventral) en un microscopio óptico a 40X para cuantificar el número, tamaño y tipo de clon o mancha. La lectura se realizó bajo estricta clave para evitar prejuicios. 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 trataron de analizar mínimo 55 individuos por tratamiento, de acuerdo con lo sugerido por Frei y Würigler (1995).

Finalmente, para evaluar la genotoxicidad de los colorantes, se aplicó el programa estadístico para SMART PC-versión 2.1, desarrollado por Frei y Würigler en 1988, el cual se basa en la prueba no paramétrica de ji cuadrada para proporciones (de una cola), con un grado de libertad y una probabilidad 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 ó más células), así como de las gemelas. El diagnóstico estadístico generado por este programa puede ser cualquiera de los siguientes:

- i. Que se acepte la hipótesis nula (H_0) y se rechace la hipótesis alternativa (H_a): negativo
- ii. Que se acepte H_a y se rechace H_0 : positivo.
- iii. Que se acepte H_a cuando H_0 es verdadera: débil positivo
- iv. Que no se rechace H_0 cuando es falsa, o que no se rechace H_0 cuando la H_a es verdadera: indeciso⁶

Para corroborar los resultados obtenidos en la prueba SMART y para discernir los resultados débiles positivos o indecisos, se aplicó la prueba no paramétrica de U de Mann-Whitney con modificación para una cola para datos individuales (Frei, comunicación personal). Se empleó para ello el programa estadístico STAI graphics versión 6.0. En este caso, el diagnóstico estadístico puede ser no significativo o significativo con probabilidades menores o iguales a 0.05, 0.01 ó 0.001.

⁶ De acuerdo con Villalobos-Pietrini, R. (1994) Términos genéticos en español. *Rev. Int. Contam. Ambient.* 10(Supl. 1):31

8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las diferentes dosis de la mezcla comercial y sus componentes, así como las de las aminas aromáticas, oxidadas y sin oxidar, fueron probadas en ambas cruza de manera simultánea en tres ensayos independientes. No se observaron diferencias significativas entre las repeticiones de cada una de ellas, por lo que los datos se agregaron y se muestran en las tablas 8.1.1 a 8.1.3 para la fase 1 y tablas 8.2.1 a 8.2.4 para la fase 2

La frecuencia de manchas totales por individuo, obtenidas para el testigo negativo (H_2O), en ambas fases, se encontraron dentro del rango esperado. En el caso del testigo positivo, uretano 20 mM, la frecuencia de manchas totales por individuo fue, para la cruza estándar (E) de 2.8 y para la de bioactivación elevada (BE) de 13.65. Las frecuencias obtenidas en esta última cruza fueron 4.87 veces más que en la cruza E. Esta diferencia coincide con lo reportado por Frölich y Würzler (1990).

8.1 Fase 1. Mezcla comercial

El tratamiento crónico buscaba evaluar el uso prolongado de estas mezclas, sin embargo su alta toxicidad en *D. melanogaster*, no permitió hacer la evaluación a las dosis que se aplican en el cabello. En experimentos previos de toxicidad (LD_{50}), las soluciones mayores o iguales al 1% (v/v) de la mezcla, crema reveladora : crema colorante (1 : 0.7), mostró efecto insecticida en la cruza estándar. Esto determinó que se emplearan soluciones muy diluidas (0.25, 0.50 y 0.75 %) en las dos cruza de este ensayo. Es importante aclarar que la toxicidad de estos compuestos no siempre permitió revisar 55 individuos y que el número de moscas examinadas corresponde con la cantidad de adultos recuperados en cada tratamiento.

En todos los casos, en las tablas se muestran los resultados de las dos pruebas estadísticas: ji cuadrada para proporciones (de una cola), para SMART y la no paramétrica de U (Mann-Whitney-Wilcoxon) con modificación para una cola, sin embargo el análisis esta basado en la prueba de U.

Para esta fase se revisaron un total de 1121 individuos, encontrándose lo siguiente:

8.1.1 Crema colorante (Tinte, I)

Los resultados se muestran en la tabla 8.1.1 a y b y en las figuras 8.1.1 a y b

Tabla 8.1.1. Resultados obtenidos en el ensayo del ala de *Drosophila*, donde se muestra la frecuencia y el número de manchas por mosca para cada dosis, así como el diagnóstico estadístico de acuerdo con las pruebas: ji cuadrada y U de Mann-Whitney para SMART. CREMA COLORANTE (TINTE)

		Frecuencia de manchas por mosca (número de manchas por mosca) diagnóstico estadístico ¹			
Dosis en % (p/v)	Número de moscas	Manchas pequeñas (1-2 células) m = 2.00	Manchas grandes (>2 células) m = 5.00	Manchas gemelas m = 5.00	Manchas totales m = 2.00

a) Cruza: ♀ *flr*³/ TM3, *Bd*⁽⁵⁾ X ♂ *mwh*/*mwh* (Estándar)

Testigo agua	66	0.303 (20)	0.076 (5)	0.000 (0)	0.379 (25)
0.25	48	0.438 (21) i, ns	0.021 (1) -, ns	0.021 (1) i, ns	0.479 (23) i, ns
0.50	46	0.435 (20) i, ns	0.087 (4) -, ns	0.000 (0) i, ns	0.522 (24) i, ns
0.75	34	0.324 (11) i, ns	0.147 (5) i, ns	0.000 (0) i, ns	0.471 (16) i, ns

b) Cruza: ♀ ORR(1);ORR(2);*flr*²/ TM3, *Bd*⁽⁵⁾ X ♂ *mwh*/*mwh* (Bioactivación elevada)

Testigo agua	104	0.538 (56)	0.125 (13)	0.010 (1)	0.673 (70)
0.25	63	0.698 (44) -, ns	0.22 (14) -, ns	0.016 (1) i, ns	0.973 (59) w, ns
0.50	58	0.793 (46) +, *	0.086 (5) -, ns	0.000 (0) i, ns	0.879 (51) -, ns
0.75	52	0.577 (30) -, ns	0.135 (7) -, ns	0.038 (2) i, ns	0.750 (39) -, ns

¹ Diagnóstico estadístico de acuerdo a Frei y Wüergler (1988) Donde: + = positivo; - = negativo; w = débil positivo; i = indeciso; m = factor de multiplicación Nivel de probabilidad: $\alpha = \beta = 0.05$ (Prueba estadística de una sola cola). A lado se presenta el diagnóstico estadístico de acuerdo con la prueba de U de Mann-Whitney con modificación para una cola Donde: * significativo con $\text{prob} <= 0.05$; ns, no significativo.

Cruza estándar: se encontraron resultados no significativos para todas las clases de manchas y en todas las dosis probadas. Esto sugiere que la cantidad de tinte fue muy baja o que no había compuestos genotóxicos (Tabla 8.1.1 a y figura 8.1.1.a). Llamó la atención que para Tinte 0.25% (T_{25}), se presentó una reducción en la frecuencia de manchas grandes de 3.6 veces, con respecto al testigo; al analizar los datos se notó que sólo hubo un clon grande y éste era de 3-4 células. Lo que podría indicar un daño citotóxico, aunque no ocurrió lo mismo en las dosis 0.50 y 0.75%

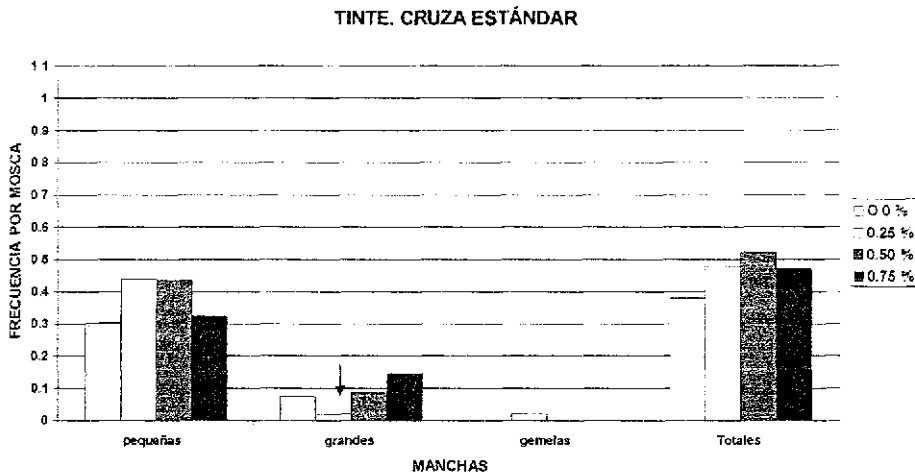


Figura 8.1.1.a Crema colorante (tinte), cruza estándar. Se presenta la frecuencia por mosca de cada uno de los tipos de manchas o clones, a las diferentes dosis probadas. Se obtuvieron resultados no significativos para todas las clases de manchas en todas las dosis probadas. La flecha señala la barra T_{25} , en donde se observa una reducción en la frecuencia de manchas grandes de 3.6 veces, con respecto al testigo.

Cruza de bioactivación elevada: se presentaron resultados no significativos para todas las clases de manchas y en todas las dosis, excepto para las manchas pequeñas de Tinte 50% (T_{50}), en donde se confirmó el resultado positivo, que no se reflejó en las manchas totales, quizá porque se presentó una reducción de 1.5 veces en la frecuencia de manchas grandes con respecto al testigo, sumado a la ausencia de manchas gemelas (Tabla 8.1.1.b y figura 8.1.1.b)

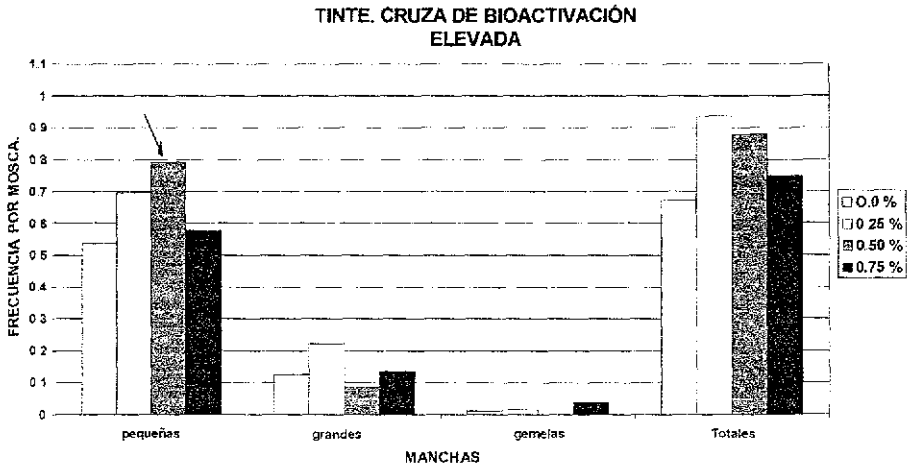


Figura 8.1.1.b Crema colorante (tinte), cruza de bioactivación elevada Se presenta la frecuencia por mosca de cada uno de los tipos de manchas o clones a las diferentes dosis probadas. La flecha señala la barra que presenta resultados positivos para la prueba de U de Mann-Whitney, con modificación para una cola, con 95% de confianza, con respecto al testigo

El encontrar resultados positivos sólo para las manchas pequeñas con T_{50} , hace suponer que, como éstas se inducen tardíamente en el desarrollo de la pupa temprana, cuando la ingestión ha cesado (Frei y Würigler, 1995), el efecto genotóxico puede deberse a la actividad de algún metabolito. Como se mencionó en la introducción, la crema colorante es la solución que contiene los intermediarios primarios y los acopladores; en el caso del tono castaño, la PFD que ya no requiere de acoplador (Burnet, 1987), por lo que se puede asumir que las enzimas del citocromo P450, constitutivas en esta cruza, activaron a la amina, considerada como promutágeno (Ames *et al.*, 1975; Albano *et al.*, 1982; Rodríguez-Arnaiz y Hernández, 1994; Gichner *et al.*, 1994; Chung *et al.*, 1995, 1996 y Chiapella, *et al.*, 1997, 2000) La cantidad de individuos recuperados en T_{75} , fue menor que en cualquiera de los otros grupos, lo que sugiere un efecto insecticida y una forma de selección, en la que sobrevivieron aquellos en los que no se presentó toxicidad ya que la frecuencia en todas las clases de manchas es similar a la del testigo agua

8.1.2. Crema reveladora (Revelador, R)

Los resultados se muestran en la tabla 8.1.2 a y b y en las figuras 8.1.2 a y b

Tabla 8.1.2. Resultados obtenidos en el ensayo del ala de *Drosophila*, donde se muestra la frecuencia y el número de manchas por mosca para cada dosis, así como el diagnóstico estadístico de acuerdo con las pruebas; j_i cuadrada y U de Mann-Whitney para SMART. CREMA REVELADORA (REVELADOR)

		Frecuencia de manchas por mosca (número de manchas por mosca) diagnóstico estadístico ¹			
Dosis en % (v/v)	Número de moscas	Manchas pequeñas (1-2 células) m = 2 00	Manchas grandes (>2 células) m = 5 00	Manchas gemelas m = 5 00	Manchas totales m = 2 00

a) Cruza: ♀ *flr³/TM3, Bd⁶⁹* X ♂ *mwh/mwh* (Estándar)

Testigo agua	66	0.303 (20)	0.076 (5)	0.000 (0)	0.379 (25)
0.25	43	0.256 (11) -, ns	0.023 (1) -, ns	0.047 (2) i, *	0.326 (14) -, ns
0.50	48	0.417 (20) i, ns	0.000 (0) -, ns	0.063 (3) i, *	0.479 (23) i, ns
0.75	46	0.391 (18) i, ns	0.217 (10) +, *	0.000 (0) i, ns	0.609 (28) i, ns

b) Cruza: ♀ *ORR(1);ORR(2);flr³/TM3, Bd⁶⁹* X ♂ *mwh/mwh* (Bioactivación elevada)

Testigo agua	104	0.538 (56)	0.125 (13)	0.010 (1)	0.673 (70)
0.25	64	0.500 (32) -, ns	0.109 (7) -, ns	0.000 (0) i, ns	0.609 (39) -, ns
0.50	58	0.448 (26) -, ns	0.069 (4) -, ns	0.034 (2) i, ns	0.552 (32) -, ns
0.75	60	0.800 (48) +, *	0.200 (12) -, ns	0.033 (2) i, ns	1.033 (62) +, *

¹ Diagnóstico estadístico de acuerdo a Frei y Wüergler (1988) Donde: + = positivo; - = negativo; i = indeciso; m = factor de multiplicación. Nivel de probabilidad: $\alpha = \beta = 0.05$ (Prueba estadística de una sola cola). A lado se presenta el diagnóstico estadístico de acuerdo con la prueba de U de Mann-Whitney con modificación para una cola. Donde: * significativo con prob. < 0.05 ; ns, no significativo

Cruza estándar: se encontró que el revelador fue genotóxico para manchas gemelas con Revelador 0.25 y 0.50 % (R_{25} y R_{50}), pero no en Revelador 0.75 % (R_{75}). Con R_{75} fue positivo para manchas grandes, éstas indican una acción genotóxica temprana, resultado de la ingestión del revelador. En la crema reveladora se encuentra el agente oxidante y otros componentes, que el producto comercial no especifica, por lo que se infiere que cualquiera de sus componentes o el mismo agente oxidante, pudieron tener el efecto genotóxico directo, al producir radicales libres (Tabla 8.1.2 a y figura 8.1.2 a).

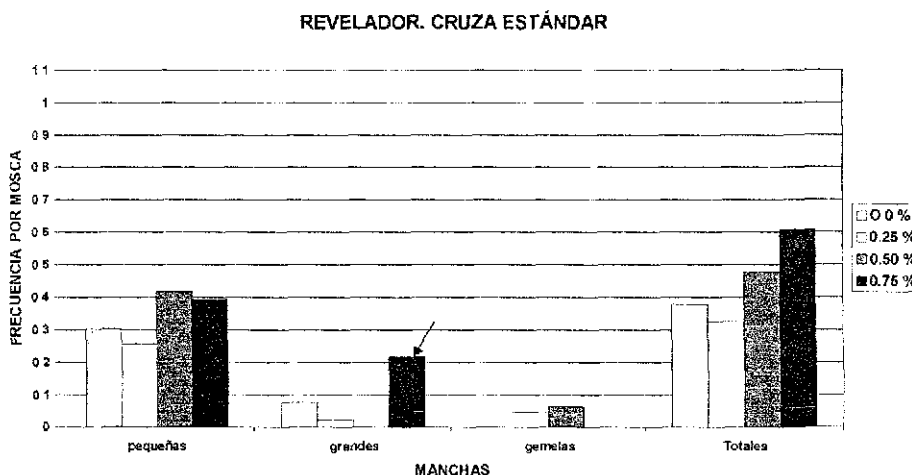


Figura 8.1.2.a Crema reveladora (revelador), cruza estándar. Se presenta la frecuencia, por mosca, de cada uno de los tipos de manchas o clones a las diferentes dosis probadas. La flecha señala la barra que presenta resultados significativos para la prueba de U de Mann-Whitney con modificación para una cola con 95 % de confianza con respecto al testigo negativo.

Cruza de bioactivación elevada: se encontraron resultados positivos en manchas pequeñas en Revelador 0.75 % (R_{75}), lo que nos sugiere que el revelador, además de contar con componentes genotóxicos directos, debe de contar con compuestos que pudieron ser activados por las enzimas

del citocromo P450, por lo que los metabolitos actuaron tardíamente, en la pupa temprana; produciendo un mayor número de manchas pequeñas. Quizá el componente que actuó como mutágeno directo en la cruz E, fue biotransformado y eliminado por las enzimas de las fases I y II del metabolismo xenobiótico y otro componente de la crema reveladora fue activado por estas mismas y se comportó como promutágeno. También es posible que el componente que resultó genotóxico directo en la cruz E, tuvo efecto citotóxico al ser activado por el citocromo P450 y posiblemente esa fue la razón de encontrar sólo manchas pequeñas en la cruz de BE. La dificultad para discutir estos resultados estriba en el desconocimiento de el(los) producto(s) químico(s) contenido(s) en la crema reveladora (Tabla 8.1 2 b y figura 8.1 2.b)

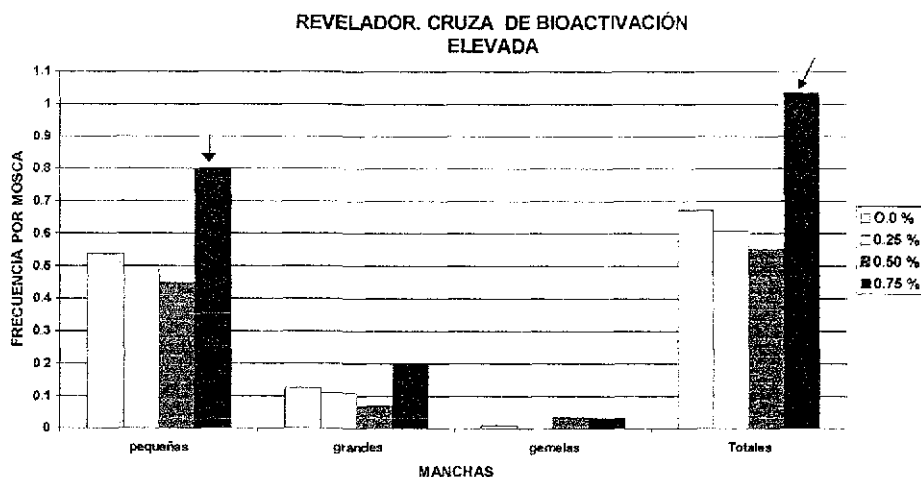


Figura 8.1.2.b Crema reveladora (Revelador), cruz de bioactivación elevada Se presenta la frecuencia, por mosca, de cada uno de los tipos de manchas o clones a las diferentes dosis probadas. Las flechas señalan las barras que representan resultados significativos para la prueba de U Mann-Whitney con modificación para una cola con 95 % de confianza con respecto al testigo agua.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

8.1.3. Tinte + Revelador (T+R)

Los resultados se muestran en la tabla 8.1 3 a y b y en las figuras 8 1 3 a y b.

Tabla 8.1.3. Resultados obtenidos en el ensayo del ala de *Drosophila*, donde se muestra la frecuencia y el número de manchas por mosca para cada dosis, así como el diagnóstico estadístico de acuerdo con las pruebas; j_i cuadrada y U de Mann-Whitney para SMART. TINTE + REVELADOR

Dosis en % (p/ v)	Número de moscas	Frecuencia de manchas por mosca (número de manchas por mosca) diagnóstico estadístico ¹			
		Manchas pequeñas (1-2 células) m = 2.00	Manchas grandes (>2 células) m = 5.00	Manchas gemelas m = 5.00	Manchas totales m = 2.00

a) Cruza: ♀ *flr³/ TM3, Bd⁸⁹* X ♂ *mwh/mwh* (Estándar)

Testigo agua	66	0.303 (20)	0.076 (5)	0.000 (0)	0.379 (25)
0.25	41	0.537 (22) +, *	0.073 (3) -, ns	0.073 (3) i, *	0.683 (28) +, *
0.50	54	0.259 (14) -, ns	0.074 (4) -, ns	0.000 (0) i, ns	0.333 (18) -, ns
0.75	52	0.462 (24) i, ns	0.115 (6) i, ns	0.000 (0) i, ns	0.577 (30) i, ns

b) Cruza: ♀ *ORR(1);ORR(2);flr³/ TM3, Bd⁸⁹* X ♂ *mwh/mwh* (Bioactivación elevada)

Testigo agua	104	0.538 (56)	0.125 (13)	0.010 (1)	0.673 (70)
0.25	62	0.500 (31) -, ns	0.177 (11) -, ns	0.016 (1) i, ns	0.694 (43) -, ns
0.50	60	0.567 (34) -, ns	0.100 (6) -, ns	0.017 (1) i, ns	0.683 (41) -, ns
0.75	62	0.645 (40) -, ns	0.161 (10) -, ns	0.048 (3) i, ns	0.855 (53) -, ns

¹ Diagnóstico estadístico de acuerdo a Frei y Wüergler (1988). Donde: + = positivo; - = negativo; i = indeciso; m = factor de multiplicación. Nivel de probabilidad: $\alpha = \beta = 0.05$ (Prueba estadística de una sola cola). A lado se presenta el diagnóstico estadístico de acuerdo con la prueba de U de Mann-Whitney con modificación para una cola. Donde:

* significativo con prob <= 0.05; ns, no significativo

Cruza estándar: se encontraron resultados positivos para manchas pequeñas y gemelas en Tinte + Revelador 0.25 % (T+R₂₅). Todos los demás resultados fueron no significativos (Tabla 8.1.3 a y figura 8.1.3.a). Se sabe que el revelador provoca la oxidación química *in vitro* de las aminas aromáticas del tinte. Se ha reportado que éstas, al ser oxidadas tienen efecto genotóxico (Rojanapo *et al.*, 1986a, b; Watanabe *et al.*, 1989, 1990 y Chung *et al.*, 1996). La ausencia de genotoxicidad en esta cruce para Tinte + Revelador 0.50 % y T+R₅ posiblemente fue consecuencia de la selección de individuos a la acción de los componentes de la mezcla tinte + revelador.

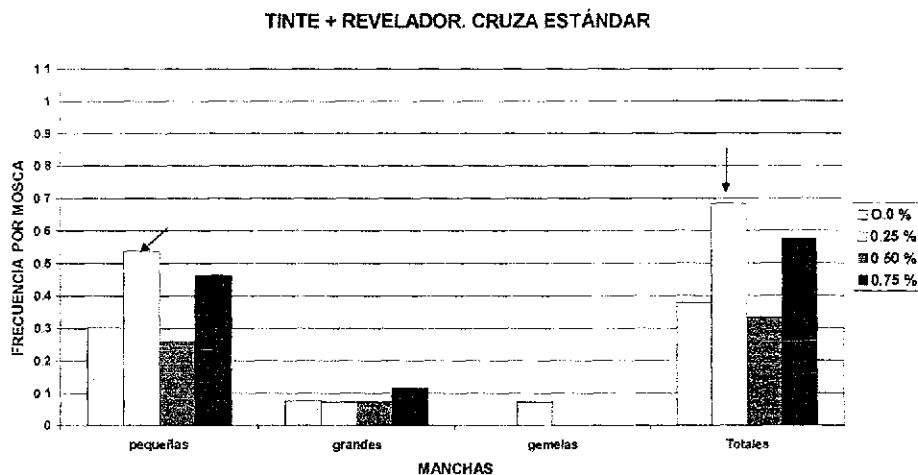


Figura 8.1.3.a Tinte + Revelador, cruce estándar. Se presenta la frecuencia, por mosca, de cada uno de los tipos de manchas o clones a las diferentes dosis probadas. Las flechas señalan las barras que presentan resultados significativos para la prueba de U de Mann-Whitney con modificación para una cola con 95% de confianza con respecto al testigo negativo.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Cruza de bioactivación elevada: no se encontró efecto genotóxico de la mezcla tinte + revelador, ni muestras de toxicidad (Tabla 8.1.3 b y figura 8.1 3. b). Se esperaba encontrar mayor efecto genotóxico para la mezcla, en esta cruce, ya que los reportes de Albano *et al.* (1982); Zito (1982); Watanabe *et al.* (1990) y Ferguson *et al* (1990), quienes trabajaron con mezclas comerciales en *Salmonella* TA98, en todos los casos, la oxidación y la presencia de la fracción metabólica de mamífero S9 incrementó el efecto mutagénico

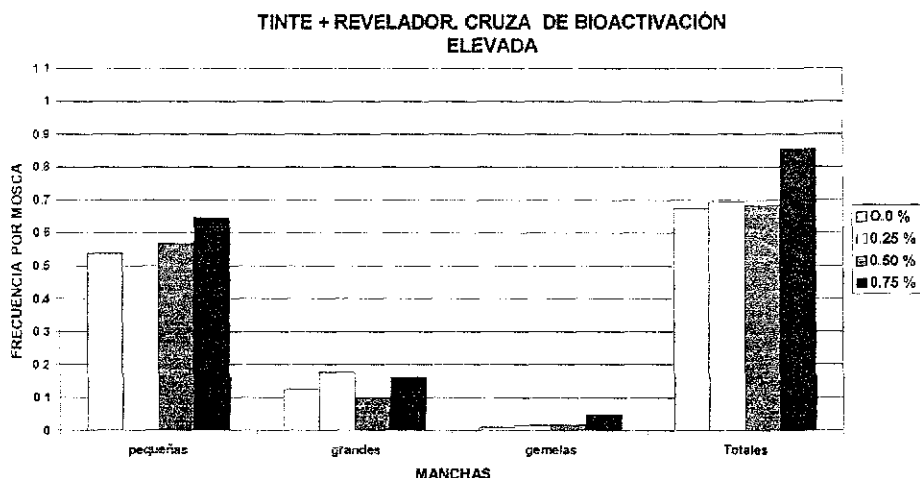


Figura 8.1.3.b Tinte + Revelador, cruce de bioactivación elevada. Se presenta la frecuencia, por mosca, de cada uno de los tipos de manchas o clones a las diferentes dosis probadas. Se obtuvieron resultados no significativos para todas las clases de manchas en todas las dosis probadas.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

8.2. Fase 2. Aminas aromáticas

Al igual que con la mezcla comercial y sus componentes, la toxicidad de estos compuestos no siempre permitió revisar 55 individuos, por lo que el número de moscas examinadas corresponde con el de adultos recuperados en cada tratamiento. A pesar de su toxicidad se realizó un tratamiento crónico para semejar el uso prolongado de éstos al aplicarse las mezclas comerciales de tintes para cabello.

Para esta fase se revisó un total de 1543 individuos, 783 para la PFD y 760 para la OFD. Al analizar las frecuencias y tipos de manchas obtenidas en cada tratamiento se encontró lo siguiente:

8.2.1. *p*-Fenilendiamina sin oxidar (PFD-s/ ox)

Los resultados se muestran en la tabla 8.2.1 a y b y en las figuras 8.2.1 a, b y c.

Las dosis utilizadas de la PFD-s/ ox no mostraron ser genotóxicas, en ambas cruzas y para todas las categorías de manchas.

En la cruce de BE, se observó una disminución, por debajo de los testigos, en las frecuencias de manchas pequeñas y totales, en las dosis 0.001 y 10.0 μ M. El caso de la dilución 10.0 μ M merece atención especial debido a que disminuyeron las frecuencias, así como la sobrevivencia (Tabla 8.2.1 b). En la figura 8.2.1 c, para la dosis 10.0 μ M, se presentó un descenso en las frecuencias de los clones *mwh* de una célula, con respecto a los otros tratamientos y al testigo. Esta reducción en el número de individuos y en la frecuencia de manchas, probablemente signifique que el compuesto, a esta dosis, tuvo un efecto tóxico. Las moscas que sobrevivieron posiblemente fueron resistentes.

Tabla 8.2.1. Resultados obtenidos en el ensayo del ala de *Drosophila*, donde se muestra la frecuencia y el número de manchas por mosca para cada dosis, así como el diagnóstico estadístico de acuerdo con las pruebas; ji cuadrada y U de Mann-Whitney para SMART. *p*-FENILENDIAMINA (PFD)

		Frecuencia de manchas por mosca (número de manchas por mosca) diagnóstico estadístico ¹			
Dosis en μ M	Número de moscas	Manchas pequeñas (1-2 células)	Manchas grandes (>2 células)	Manchas gemelas	Manchas totales
		m = 2.00	m = 5.00	m = 5.00	m = 2.00

a) Cruza: ♀ *flr³/TM3, Bd⁶⁵* X ♂ *mwh/mwh* (Estándar)

Testigo alcohol 1.2 %	88	0.62 (55)	0.12 (11)	0.05 (4)	0.80 (70)
0.001	37	0.59 (22) -, ns	0.16 (6) -, ns	0.03 (1) -, ns	0.78 (29) -, ns
0.1	45	0.80 (36) -, ns	0.16 (7) -, ns	0.09 (4) i, ns	1.04 (47) -, ns
10.0	32	0.69 (22) -, ns	0.16 (5) -, ns	0.03 (1) i, ns	0.87 (28) -, ns

b) Cruza: ♀ *ORR(1);ORR(2);flr³/TM3, Bd⁶⁵* X ♂ *mwh/mwh* (Bioactivación elevada)

Testigo alcohol 1.2 %	77	0.77 (59)	0.16 (12)	0.01 (1)	0.94 (72)
0.001	74	0.59 (44) -, ns	0.18 (13) -, ns	0.04 (3) i, ns	0.81 (60) -, ns
0.1	66	0.80 (53) -, ns	0.18 (12) -, ns	0.06 (4) i, ns	1.05 (69) -, ns
10	44	0.61 (27) -, ns	0.16 (7) -, ns	0.00 (0) i, ns	0.77 (34) -, ns

¹ Diagnóstico estadístico de acuerdo a Frei y Wüergler (1988) Donde: - = negativo; i = indeciso; m = factor de multiplicación. Nivel de probabilidad: $\alpha = \beta = 0.05$ (Prueba estadística de una sola cola) A lado se presenta el diagnóstico estadístico de acuerdo con la prueba de U de Mann-Whitney con modificación para una cola Donde: ns, no significativo

P-FENILENDIAMINA. CRUZA ESTÁNDAR

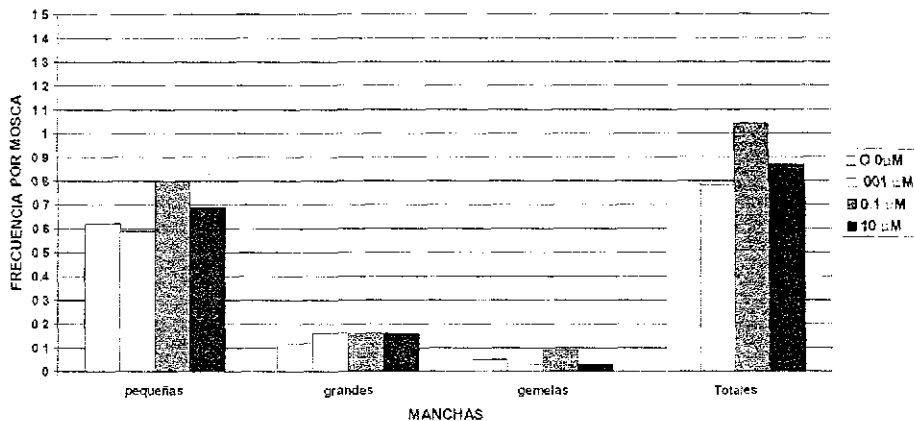


Figura 8.2.1.a *p*-Fenilendiamina (PFD), cruza estándar. Se presenta la frecuencia, por mosca, de cada uno de los tipos de manchas o clones a las diferentes dosis probadas. Se obtuvieron resultados no significativos para todas las clases de manchas en todas las dosis probadas.

P-FENILENDIAMINA. CRUZA DE BIOACTIVACIÓN ELEVADA

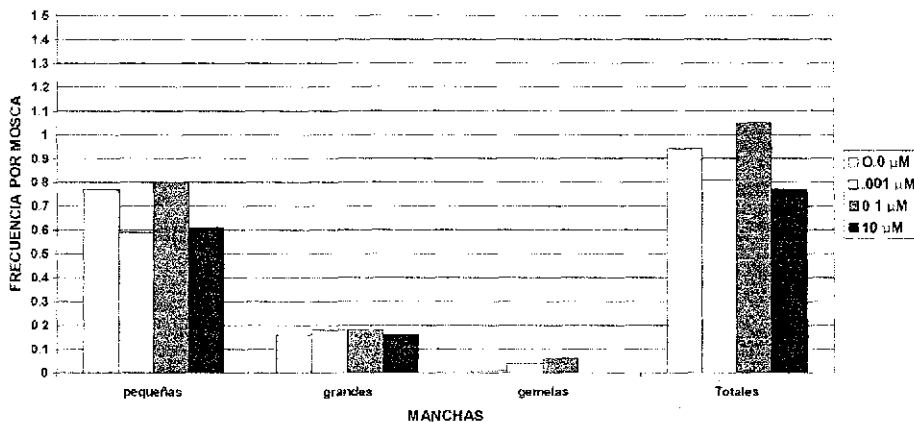


Figura 8.2.1.b *p*-Fenilendiamina (PFD), cruza de bioactivación elevada. Se presenta la frecuencia, por mosca, de cada uno de los tipos de manchas o clones a las diferentes dosis probadas. Se obtuvieron resultados no significativos para todas las clases de manchas en todas las dosis probadas.

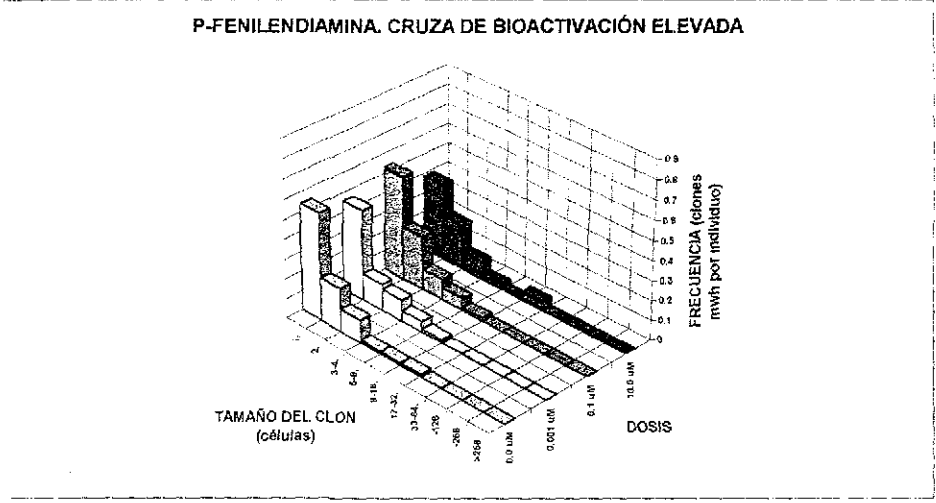


Figura 8.2.1.c *p*-Fenilendiamina (PFD), cruce de bioactivación elevada. Se presenta la frecuencia de clones *mwh* por mosca, de diferente número de células a las diferentes dosis probadas. Se observa una ligera disminución en la frecuencia de clones *mwh* de una sola célula, en las dosis 0.001 y 10.0 μM, con respecto al testigo

Batiste-Alentorn *et al.* (1995) estudiaron este compuesto sin oxidar en las pruebas SMART del ojo (*zeste-white* y *white-ivory*) y ala, cruce estándar (machos *flr³* x hembras *mwh*) y obtuvieron resultados positivos en la última de ellas an las dosis 1.0 y 2.0 mM, para manchas pequeñas y grandes, cabe hacer notar que las cantidades que probaron fueron mucho más altas que las utilizadas en este trabajo, las cuales fueron calculadas con base en Burnett *et al.* (1977) quienes indican que los seres humanos se exponen mensualmente a alrededor de 40 mg/ Kg de PFD, en cada aplicación de tinte Burnett y Goldenthal (1988) mencionan que, en aquellos trabajos que tienen resultados positivos para esta amina, los investigadores utilizaron en un solo ensayo, concentraciones notablemente más altas que las que contienen los tintes, por lo que no corresponden con la realidad De acuerdo con los resultados de las dosis empleadas en este trabajo la PFD s/ ox no es genotóxica

8.2.2. *o*-Fenilendiamina sin oxidar (OFD-s/ ox)

Los resultados se muestran en la tabla 8.2.2 a y b y en las figuras 8.2.2 a y b.

Tabla 8.2.2. Resultados obtenidos en el ensayo del ala de *Drosophila*, donde se muestra la frecuencia y el número de manchas por mosca para cada dosis, así como el diagnóstico estadístico de acuerdo con las pruebas: ji cuadrada y U de Mann-Whitney para SMART. *o*-FENILENDIAMINA (OFD)

		Frecuencia de manchas por mosca (número de manchas por mosca) diagnóstico estadístico ¹			
Dosis en μ M	Número de moscas	Manchas pequeñas (1-2 células) m = 2 00	Manchas grandes (>2 células) m = 5 00	Manchas gemelas m = 5 00	Manchas totales m = 2 00

a) Cruza: ♀ *flr*¹/ TM3, *Bd*⁶⁹ X ♂ *mwh*/*mwh* (Estándar)

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

b) Cruza: ♀ ORR(1);ORR(2);*flr*¹/ TM3, *Bd*⁶⁹ X ♂ *mwh*/*mwh* (Bioactivación elevada)

Testigo agua	97	0.56 (54)	0.13 (13)	0.08 (8)	0.77 (75)
0.6	75	0.85 (64) +, *	0.07 (5) -, ns	0.01 (1) -, ns	0.93 (70) -, ns
1	55	0.84 (46) +, *	0.13 (7) -, ns	0.02 (1) -, ns	0.98 (54) -, ns
2	56	0.62 (35) -, ns	0.21 (12) -, ns	0.00 (0) -, ns	0.84 (47) -, ns

¹ Diagnóstico estadístico de acuerdo de Frei y Wüergler (1988). Donde: + = positivo, - = negativo; i = indeciso; m = factor de multiplicación Nivel de probabilidad: $\alpha = \beta = 0.05$ (Prueba estadística de una sola cola) A lado se presenta el diagnóstico estadístico de acuerdo con la prueba de U de Mann-Whitney con modificación para una cola Donde: * significativo con prob. < = 0.05; ns, no significativo.

Cruza estándar: se encontraron resultados no significativos para todas las dosis y tipos de manchas, por lo que se puede establecer que la OFD-s/ ox en las concentraciones utilizadas para la craza E no tienen efecto genotóxico (Tabla 8 2.2 a y figura 8 2.2 a)

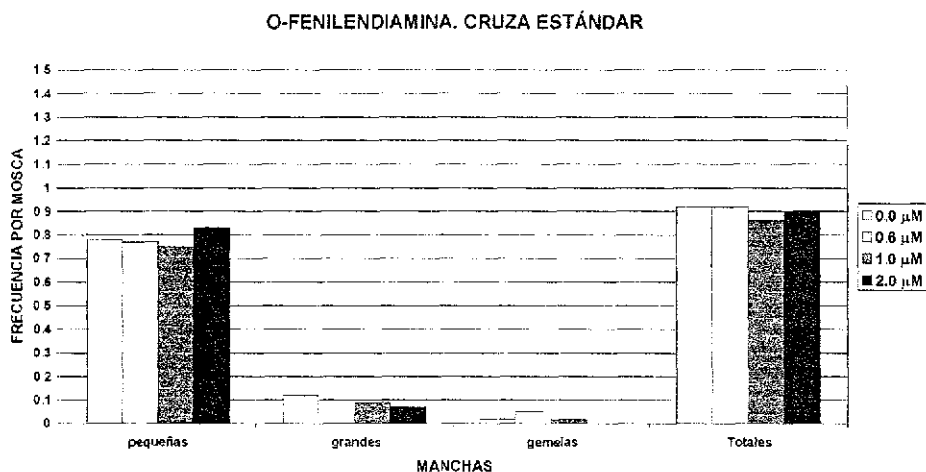


Figura 8.2.2.a o-Fenilendiamina (OFD), craza estándar. Se presenta la frecuencia, por mosca de cada uno de los tipos de manchas o clones a las diferentes dosis probadas. Las diferencias no fueron significativas para todas las clases de manchas en todas las dosis probadas.

Cruza de bioactivación elevada: se encontró que, al exponer las tres dosis de la OFD-s/ ox a esta craza, sólo las de 0.6 y 1.0 μM presentaron efecto genotóxico, con 95 % de confianza, exclusivamente para las manchas pequeñas. Lo que indicaría que esta amina posiblemente fue activada por los citocromos P450, produciendo mayor número de manchas pequeñas. Sin embargo, con la dosis 2.0 μM , la OFD-s/ ox no mostró efecto. Esto podría ser explicado por una selección de individuos resistentes al daño, sólo aquellos organismos resistentes estarían sobreviviendo sin evidenciar efectos de genotoxicidad (Tabla 8 2.2 b y figura 8 2.2 b).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

O-FENILENDIAMINA. CRUZA DE BIOACTIVACIÓN ELEVADA

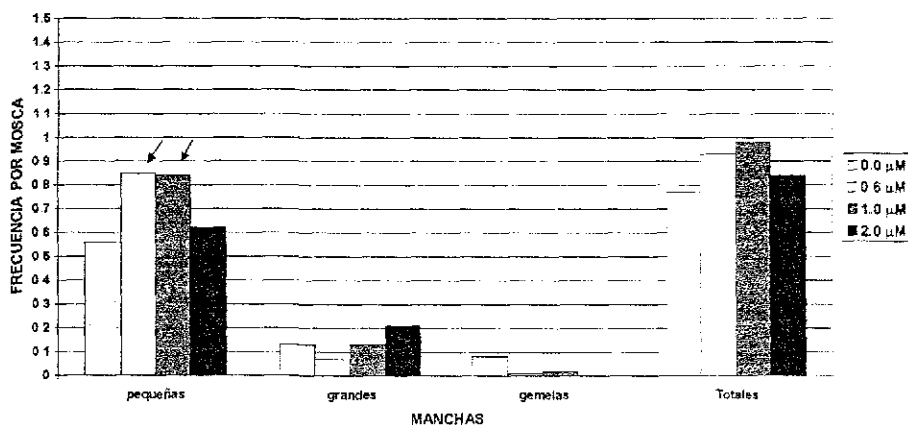


Figura 8.2.2.b *o*-Fenilendiamina (OFD), cruza de bioactivación elevada. Se presenta la frecuencia por mosca de cada uno de los tipos de manchas o clones a las diferentes dosis probadas. Las flechas señalan las barras que presentan resultados significativos para la prueba de U de Mann-Whitney con modificaciones para una cola con 95 % de confianza, con respecto al testigo agua.

Este resultado concuerda con el trabajo de Wild *et al.* (1980) en el que reportan que la OFD, después de ser activada por las monooxigenasas, producen micronúcleos en médula ósea de ratón, conejillos de indias y criceto (hámster) Chino; con algunos trabajos donde describen que la OFD es un promutágeno en *Salmonella*, después de activación vegetal (Gentile *et al.*, 1987; Plewa *et al.*, 1993 y Gichner *et al.*, 1994); de activación por S9 (Shahin, 1989 y Chung *et al.*, 1995, 1996) y con aquellos que incluso utilizan la OFD como promutágeno y testigo positivo, en ensayos de mutagénesis (Xiao e Ichicawa, 1998; Cebulska-Wasilewska *et al.*, 1998 y Gichner y Velemínský, 1999).

En resumen, con la cruza E no se encontró efecto genotóxico para ninguna de las dos aminas sin oxidar. Esto podría ser explicado por cualquiera de las dos siguientes posibilidades: las dosis fueron muy bajas para producir efectos o bien, la oxidación química y/ o metabólica es

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

necesaria para observar un efecto mutagénico inducido por estas aminas (Rojanapo *et al.*, 1986 a, b; Zito, 1982; Watanabe *et al.*, 1989, 1990; Chung *et al.*, 1995, 1996).

Con la cruza de BE la OFD-s/ ox es genotóxica para manchas pequeñas a las dosis de 0.6 y 1.0 μM , pero no lo es a 2.0 μM . Esto podría ser explicado por una selección de individuos resistentes al daño. Estos resultados concuerdan con los reportes de Wild *et al.* (1980), Watanabe *et al.* (1989), Zito (1982); Rodríguez-Arnaiz y Hernández (1994), Shahin (1994), Chung *et al.* (1995, 1996) y Chiapella *et al.* (1997, 2000), que indican que las aminas nitroaromáticas deben ser activadas metabólicamente para ser genotóxicas. En esta cruza, la PFD-s/ ox, no mostró efecto genotóxico en ninguna de las dosis probadas, esto podría deberse a las bajas dosis empleadas o a que esta amina sin oxidar no es promutágena.

8.2.3. *p*-fenilendiamina oxidada (PFD-OX)

Los resultados se muestran en la tabla 8.2.3. a y b y en las figuras 8 2 3 a, b y c

Tabla 8.2.3. Resultados obtenidos en el ensayo del ala de *Drosophila*, donde se muestra la frecuencia y el número de manchas por mosca para cada dosis, así como el diagnóstico estadístico de acuerdo con las pruebas: ji cuadrada y U de Mann-Whitney para SMART. *p*-FENILENDIAMINA OXIDADA con H₂O₂ al 6 % (v/v) 1:1 (PFD-ox)

		Frecuencia de manchas por mosca (número de manchas por mosca) diagnóstico estadístico ¹			
Dosis en μ M	Número de moscas	Manchas pequeñas (1-2 células) m = 2 00	Manchas grandes (>2 células) m = 5 00	Manchas gemelas m = 5 00	Manchas totales m = 2 00

a) Cruza: ♀ *flr³/TM3, Bd⁶⁹* X ♂ *mwh/mwh* (Estándar)

Testigo alcohol 1.2 %	88	0.62 (55)	0.12 (11)	0.05 (4)	0.80 (70)
0.001	35	0.77 (27) -, ns	0.09 (3) -, ns	0.06 (2) i, ns	0.91 (32) -, ns
0.1	34	0.47 (16) -, ns	0.06 (2) -, ns	0.03 (1) -, ns	0.56 (19) -, ns
10	48	0.60 (29) -, ns	0.04 (2) -, ns	0.02 (1) i, ns	0.67 (32) -, ns

b) Cruza: ♀ *ORR(1);ORR(2);flr³/TM3, Bd⁶⁹* X ♂ *mwh/mwh* (Bioactivación elevada)

Testigo alcohol 1.2 %	77	0.77 (59)	0.16 (12)	0.01 (1)	0.94 (72)
0.001	74	0.86 (64) w, ns	0.14 (10) -, ns	0.01 (1) i, ns	1.01 (75) -, ns
0.1	60	0.82 (49) -, ns	0.17 (10) -, ns	0.03 (2) i, ns	1.02 (61) -, ns
10	64	0.95 (61) w, ns	0.14 (9) -, ns	0.05 (3) i, ns	1.14 (73) -, ns

¹ Diagnóstico estadístico de acuerdo a Frei y Wüergler (1988). Donde: w = débil positivo; - = negativo; i = indeciso; m = factor de multiplicación. Nivel de probabilidad: $\alpha = \beta = 0.05$. (Prueba estadística de una sola cola) A lado se presenta el diagnóstico estadístico de acuerdo con la prueba de U de Mann-Whitney con modificación para una cola. Donde: ns, no significativo.

Cruza estándar: se encontraron resultados no significativos para toda las clases de manchas en todas las dosis empleadas. Cabe hacer notar que en las dosis 0.1 y 10 μM , se observaron frecuencias más bajas que las del testigo para todos los grupos de manchas e incluso en la dosis 10 μM se presentó una reducción en la frecuencia de manchas grandes de 3 veces con respecto al testigo. Estos resultados sugieren que el producto oxidado de la PFD probablemente afectó de alguna manera a los individuos (Tabla 8.2.3 a y figura 8.2.3 a)

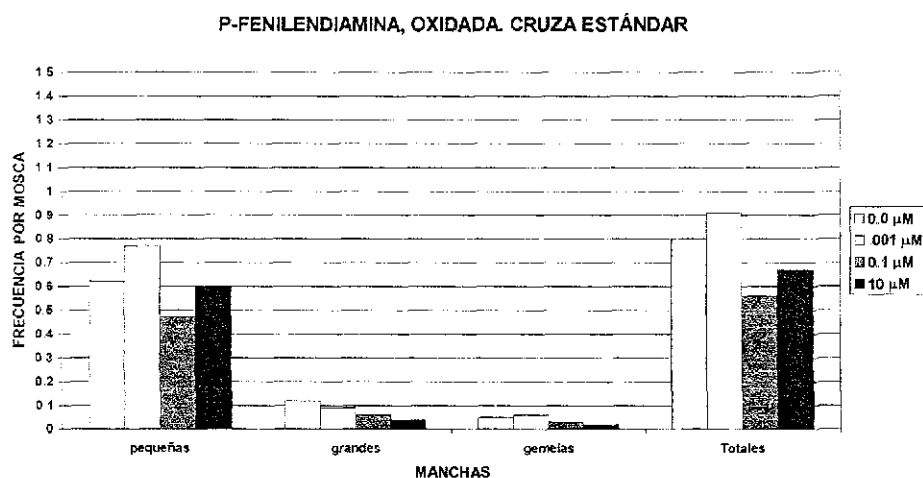


Figura 8.2.3.a *p*-Fenilendiamina oxidada con H_2O_2 al 6 % (v/v) 1:1 (PFD-ox), cruza estándar.

Se presenta la frecuencia por mosca, de cada uno de los tipos de manchas o clones a las diferentes dosis probadas. Se obtuvieron resultados no significativos para todas las clases de manchas a todas las dosis probadas.

Cruza de bioactivación elevada: se encontraron resultados no significativos para todas las clase de manchas y en todas las dosis (Tabla 8.2.3 b y figura 8.2.3 b). No obstante, Venitt *et al.* (1975), Kirkland y Venitt, (1976) y Benedit, (1976), Rojanapo *et al.* (1986b) y Chung *et al.* (1996) reportaron que la PFD-ox es genotóxica. Ames *et al.* (1975) Venitt y Searle (1976) coinciden que la PFD es promutágeno y Gichner *et al.* (1994) la define como promutágeno débil.

P-FENILENDIAMINA, OXIDADA. CRUZA DE BIOACTIVACIÓN ELEVADA

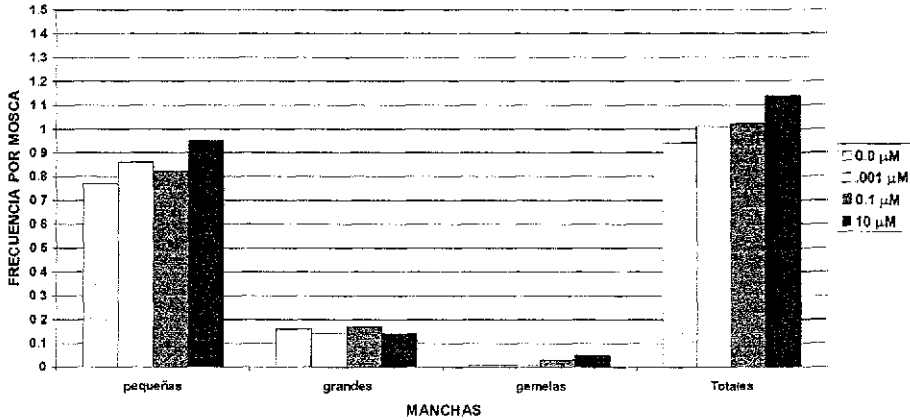


Figura 8.2.3.b *p*-Fenilendiamina oxidada con H₂O₂ al 6 % (v/v) 1:1 (PFD-ox), cruza de bioactivación elevada. Se presenta la frecuencia por mosca, de cada uno de los tipos de manchas o clones a las diferentes dosis probadas. Se obtuvieron resultados no significativos para todas las clases de manchas a todas las dosis probadas.

En la figura 8.2.3 c se observa, en la concentración 10 μM, un incremento en la proporción de clones *mwh* de una célula y una reducción de clones de dos células 2-3 veces con respecto al testigo, que podría indicar un efecto negativo en proliferación celular, mencionado con anterioridad en cultivo de células de criceto Chino (Chung *et al.*, 1995) y en cultivo de linfocitos humanos (Cebulska-Wasilewska *et al.*, 1998), también podría deberse a que esta amina, oxidada y activada metabólicamente, presente efecto clastogénico (Kirkland y Venitt, 1976 y Benedit, 1976)

P-FENILENDIAMINA OXIDADA. CRUZA DE BIOACTIVACIÓN ELEVADA

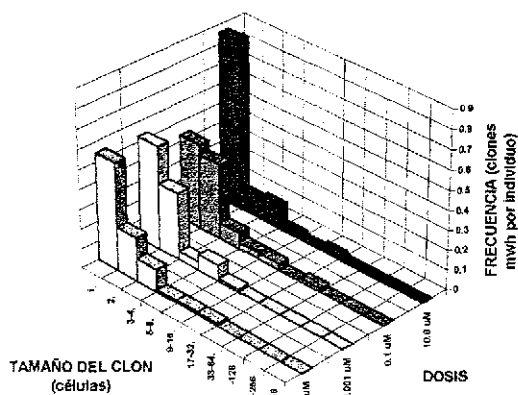


Figura 8.2.3.c *p*-Fenilendiamina oxidada con H_2O_2 al 6 % (v/v) 1:1 (PFD-ox), cruza de bioactivación elevada. Se presenta la frecuencia de clones *mwh* por mosca, de diferente número de células a las diferentes dosis probadas. Se observa, en la dosis de 10 μ M incremento en la proporción de clones de una célula y claro decremento en la de dos células, con respecto al testigo negativo.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

8.2.4. *o*-Fenilendiamina oxidada (OFD-ox)

Los resultados se muestran en la tabla 8.2.4. a y b y en las figuras 8.2.4. a, b y c

Tabla 8.2.4. Resultados obtenidos en el ensayo del ala de *Drosophila*, donde se muestra la frecuencia y el número de manchas por mosca para cada dosis, así como el diagnóstico estadístico de acuerdo con las pruebas; ji cuadrada y U de Mann-Whitney para SMART. *o*-FENILENDIAMINA OXIDADA con H₂O₂ al 6 % (v/v) 1:1 (OFD-ox)

		Frecuencia de manchas por mosca (número de manchas por mosca) diagnóstico estadístico ¹			
Dosis en µM	Número de moscas	Manchas pequeñas (1-2 células) m = 2.00	Manchas grandes (>2 células) m = 5.00	Manchas gemelas m = 5.00	Manchas totales m = 2.00

a) Cruza: ♀ *flr³/TM3, Bd⁶⁹* X ♂ *mwh/mwh* (Estándar)

Testigo agua	118	0.78 (92)	0.12 (14)	0.02 (2)	0.92 (108)
0.6	48	1.35 (65) +, ***	0.10 (5) -, ns	0.02 (1) i, ns	1.48 (71) +, ***
1	10	0.47 (16) i, ns	0.06 (2) -, ns	0.03 (1) i, ns	0.56 (19) i, ns

b) Cruza: ♀ *ORR(1);ORR(2);flr³/TM3, Bd⁶⁹* X ♂ *mwh/mwh* (Bioactivación elevada)

Testigo agua	97	0.56 (54)	0.13 (13)	0.08 (8)	0.77 (75)
0.6	59	0.92 (54) +, *	0.12 (7) -, ns	0.00 (0) -, ns	1.01 (75) w, ns
1	20	0.80 (16) i, ns	0.05 (1) -, ns	0.05 (1) -, ns	0.90 (18) -, ns
2	39	1.04 (40) +, **	0.10 (4) -, ns	0.08 (3) -, ns	1.21 (47) +, **

¹ Diagnóstico estadístico de acuerdo a Frei y Wüergler (1988) Donde: + = positivo; w = débil positivo; - = negativo; i = indeciso; m = factor de multiplicación. Nivel de probabilidad: $\alpha = \beta = 0.05$ (Prueba estadística de una sola cola) A lado se presenta el diagnóstico estadístico de acuerdo con la prueba de U de Mann-Whitney con modificación para una cola Donde: * significativo con prob. ≤ 0.05 ; ** significativo con prob ≤ 0.01 ; *** significativo con prob ≤ 0.001 ; ns, no significativo

Cruza estándar: se encontraron resultados significativos para manchas pequeñas para la dosis 0.6 μM con un 99.9% de confianza. El resto de los tratamientos fueron no significativos para todos los tipos de manchas (Tabla 8.2.4 a y figura 8.2.4.a). A 1.0 μM , se produjo un número muy bajo de individuos y a 2.0 μM no se pudieron recuperar adultos. Lo que sugiere que la oxidación de la OFD es requisito para un efecto genotóxico y que el compuesto, producto de la oxidación de la OFD, es tóxico para esta craza a 2.0 μM . El tamaño de las manchas posiblemente indica que se trata de un promutágeno. Una observación interesante es que el número de moscas recuperadas sin manchas se redujo, de tal manera que 75 y 80% de las moscas sobrevivientes de las dosis 0.6 y 1.0 μM respectivamente tuvieron de 1 a 4 manchas por mosca, mientras que en el testigo sólo el 58.5% de las recuperadas tuvieron este número de manchas (figura 8.2.4.b).

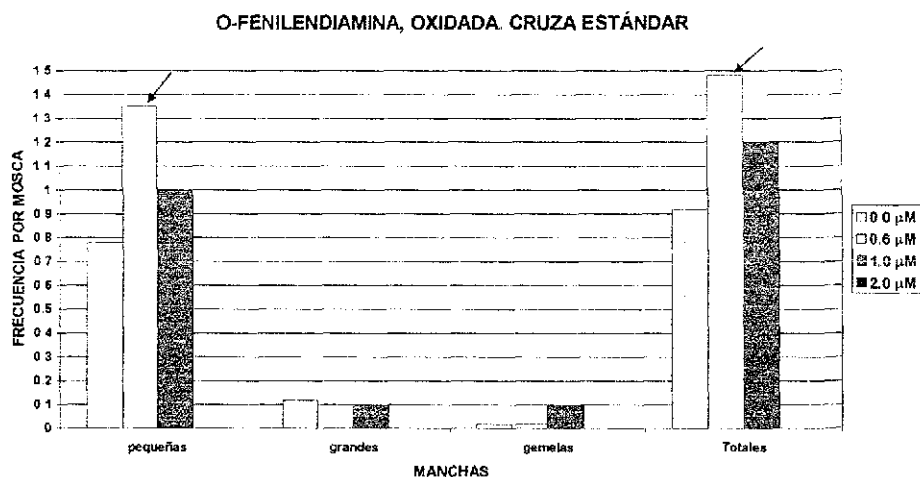


Figura 8.2.4.a *o*-Fenilendiamina oxidada con H_2O_2 al 6% (v/v) 1:1 (OFD-ox), craza estándar.

Se presenta la frecuencia por mosca, de cada uno de los tipos de manchas o clones a las diferentes dosis probadas. Las flechas señalan las barras que presentan resultados significativos para la prueba de U de Mann-Whitney con modificación para una cola, con 99.9% de confianza, con respecto al testigo agua.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

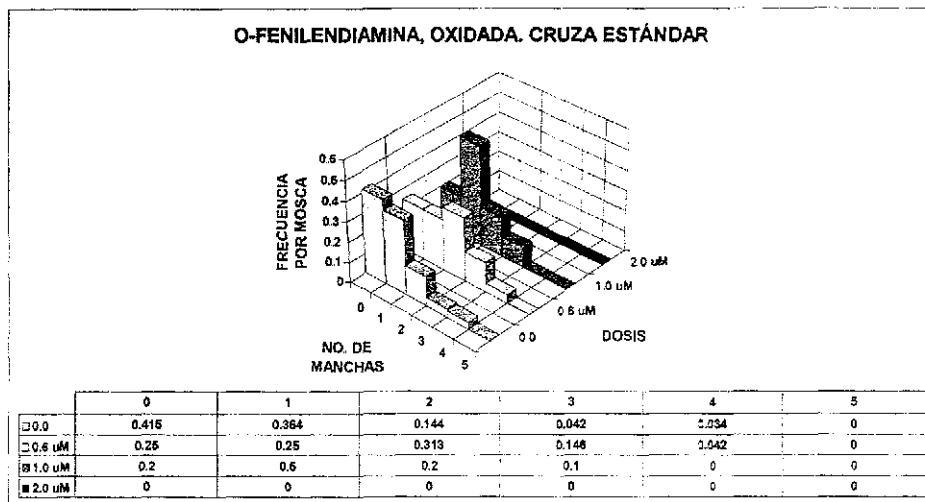


Figura 8.2.4.b *o*-Fenilendiamina oxidada con H_2O_2 al 6 % (v/v) 1: 1 (OFD-ox), cruza estándar.

Se presenta la frecuencia del número de manchas por mosca a las diferentes dosis probadas. Se observa que en las dosis de 0.6 y 1.0 μM sólo el 25 y 20 %, respectivamente, de las moscas sobrevivientes no presentan manchas a diferencia de el 41.5 % observado en el testigo.

Cruza de bioactivación elevada: se obtuvieron resultados significativos con un 95 % de confianza para las manchas pequeñas de las dosis 0.6 μM , no significativo para todas las clases de manchas a 1.0 μM y significativo con 99 % de confianza, para las manchas pequeñas de la dosis 2.0 μM (Tabla 8.2.4 b y figura 8.2.4 c). Estos resultados indican que el producto oxidado de esta amina se comportó como un promutágeno, que al ser activado por los citocromos P450 produjo mayor efecto (Watanabe, *et al.*, 1989; Zito, 1982; Rodríguez-Arnaiz y Hernández, 1994; Shahin, 1994; Chung, *et al.*, 1995).

El obtener resultados significativos en las dosis 0.6 y 2.0 μM y no en 1.0 μM sugiere un posible error metodológico, sin embargo, se observó el mismo patrón en los tres experimentos independientes.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

O-FENILENDIAMINA, OXIDADA. CRUZA DE BIOACTIVACIÓN ELEVADA

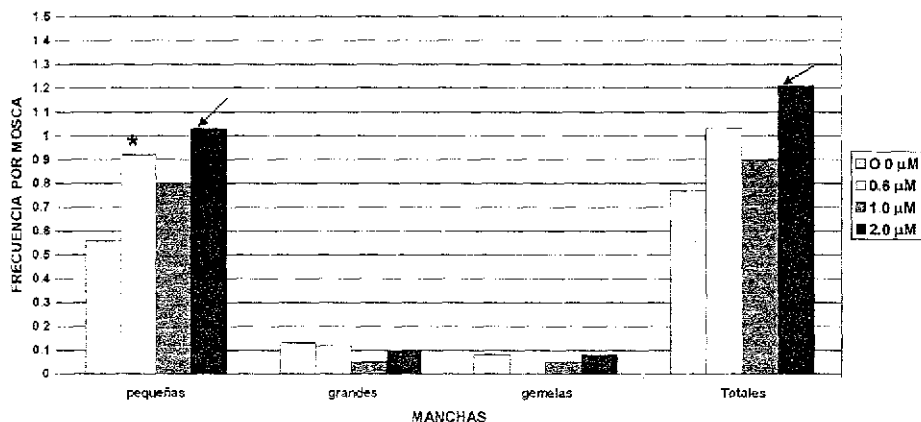


Figura 8.2.4.c *o*-Fenilendiamina oxidada con H_2O_2 al 6 % (v/v) 1:1 (OFD-ox), cruzada de bioactivación elevada. Se presenta la frecuencia por mosca, de cada uno de los tipos de manchas o clones a las diferentes dosis probadas. Las flechas señalan las barras que presentan resultados significativos para la prueba de U de Mann-Whitney con modificación para una cola, con 99 % de confianza, y el * representa resultados significativos para la misma prueba pero con 95 % de confianza, con respecto al testigo agua

Al comparar las respuestas de la OFDs/ ox y de la OFD-ox en ambas cruza, se encontró que en la cruzada E, la OFDs/ ox no es tóxica, ni genotóxica, al activarla con las enzimas presentes de manera constitutiva en la cruzada de BE, se comportó como un promutágeno en 0.6 y 1.0 μM y en 2.0 μM no presentó efecto, por lo que resultó tóxica y sólo fue posible recuperar moscas resistentes. Lo que sugiere que de alguna manera, a esta dosis, se induce la expresión de algún grupo de enzimas que ayudaron a la desintoxicación, éstas pueden ser del tipo de las proteínas de estrés u otras enzimas del metabolismo de xenobióticos. Al oxidar la amina aromática con peróxido de hidrógeno en ambas cruza se presentó efecto genotóxico con 0.6 μM así como tóxico para la OFD-ox, reflejado en la reducción del número de adultos recuperados a 1.0 μM , en ambos casos se asume que las pocas moscas que se recuperaron son resistentes lo que explica los resultados negativos. En la cruzada E, en la dosis 2.0 μM no se recuperaron adultos, sin embargo en

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

la cruce de BE, se vuelve a incrementar la cantidad de moscas recuperadas, pero además con efecto genotóxico. Al considerar la hipótesis de que a esta dosis y en esta cruce se encienden enzimas que ayudan a la desintoxicación se puede explicar este resultado. El hecho de que se encontrara efecto genotóxico a 2.0 μM se puede dilucidar considerando que la OFD-ox tiene mayor potencial mutagénico que la OFD-s/ ox (Watanabe *et al.*, 1989; Zito, 1982; Rodríguez-Arnaiz y Hernández, 1994; Shahin, 1994; Chung *et al.*, 1995). Sin embargo, dadas las características de este trabajo, la hipótesis de la inducción de las enzimas involucradas en la desintoxicación no puede ser probada, ya que se requeriría de otra metodología para hacerlo.

En resumen: en la cruce E, la OFD-ox presentó efecto genotóxico en manchas pequeñas a 0.6 μM y efecto tóxico a 1.0 y 2.0 μM y la PFD-ox no mostró efecto genotóxico ni tóxico, aún cuando se empleó una dosis mayor (10.0 μM) que las usadas en el caso de la OFD-ox. La oxidación de la OFD es requisito para un efecto genotóxico (Zito, 1982; Watanabe *et al.*, 1990; Wagner *et al.*, 1996).

En la cruce de BE, la PFD-ox arrojó resultados no significativos aunque con la prueba de ji-SMERT se obtuvieron resultados débilmente positivos para manchas pequeñas en las dosis 0.001 y 10.0 μM . Con la OFD-ox, hay efecto genotóxico para manchas pequeñas a 0.6 y 2.0 μM . Esta amina previamente oxidada posiblemente fue activada por los citocromos P450, produciendo mayor frecuencia de manchas pequeñas.

Se encontró mayor efecto genotóxico en la OFD oxidada y sin oxidar que en la PFD oxidada y sin oxidar, para ambas cruces con la siguiente jerarquía: OFD-ox, cruce de BE > OFD-ox, cruce E > OFD-s/ ox, cruce de BE > OFD-s/ ox, cruce E > PFD-ox, cruce de BE. En las combinaciones PFD-ox, cruce E y PFD-s/ ox, en ambas cruces, no se notó efecto genotóxico.

Estos resultados concuerdan con los trabajos de Sontang (1981), Suzuki *et al.* (1983) y Shahin (1989) quienes mencionan que las anilinas con radicales *para* han mostrado ser compuestos menos activos que los *orto*. Gentile *et al.* (1987) y Chung *et al.* (1995, 1996) quienes encontraron que las OFD y *m*-Fenilendiamina (MFD), después de activación metabólica, fueron

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

muy mutagénicas en *Salmonella* TA98, pero débilmente mutagénicas en TA100; mientras que la PFD después de activación metabólica con S9, mostró un efecto débil positivo en TA98 y no tuvo actividad mutagénica en la cepa TA100. Los autores mencionados reportan el orden siguiente de actividad mutagénica en *Salmonella* TA98 y TA100: OFD > MFD > PFD. Sin embargo, Chung *et al* (1995), describen que la capacidad de inducir aberraciones cromosómicas, en células de criceto (hámster) Chino, en ausencia de activación metabólica S9 fue: PFD > OFD > MFD.

Chiapella *et al* (1997), ensayó los tres isómeros *o*-, *m*- y *p*-fenilendiamina en dos sistemas de activación vegetal (*Persea americana* S117 con alta concentración de citocromo P450 y baja en actividad peroxidasa y *Zea mays* S9 con actividad peroxidasa solamente) con la prueba de *Salmonella* TA98 y TA100, de las tres aminas estudiadas, sólo la MFD fue activada en un producto mutagénico, en ambos sistemas, pero con respuesta diferente (*P americana* > *Z. mays*) Sin embargo, las tres aminas producen mutaciones en *Tradescantia* clon 4430 (S14) (Gichner, *et al* 1994). Por otro lado, la MFD puede ser activada en tabaco, algodón y zanahoria, pero la PFD no (Gentile *et al.*, 1987; Lhotka *et al.*, 1987 y Plewa *et al.*, 1988)

9. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.

- ❑ Las cruza E y de BE se comportaron según lo esperado frente al agua y al uretano, por lo que se corrobora la presencia de los marcadores genéticos y de las enzimas en cada una de las cruza.

9.1. Fase 1

- ❑ Debido a la alta toxicidad de los tintes para cabello y al uso de soluciones menores a 1%, los resultados positivos obtenidos en este ensayo posiblemente reflejan sólo una parte de su capacidad de daño. Se recomienda evaluar las mezclas en protocolos de tratamiento agudo con mezclas menos diluidas
- ❑ La interpretación de los resultados positivos observados con todos los componentes de la mezcla comercial es difícil, porque son tantas las sustancias, reacciones químicas y metabolitos que intervienen, que no se puede discernir con certeza cual o cuales son los causantes del efecto. Sin embargo se sabe que el color castaño contiene principalmente *p*-fenilendiamina por lo que, considerando los antecedentes de esta amina, se puede sugerir una importante participación de este componente en los resultados obtenidos
- ❑ Se encontró que la crema colorante contiene promutágenos que requieren ser activados por los citocromos P450.
- ❑ Las diferencias significativas entre las frecuencias de manchas pequeñas, en la dosis R₇₅ cruza de BE, con respecto al testigo, demuestra que en la crema reveladora hay efecto genotóxico indirecto
- ❑ Se encontró además que la crema reveladora contiene compuestos que se comportan como mutágenos directos.
- ❑ Con la mezcla (crema colorante + crema reveladora) se notó un efecto positivo, por diferencias significativas en la frecuencia de manchas pequeñas y gemelas en la cruza E.

9.2. Fase 2

- Con respecto a las aminas aromáticas: la PFD sin oxidar, a las dosis probadas en este ensayo, no mostró efecto genotóxico
- La PFD oxidada, se comportó como promutágeno débil en la cruzada BE
- La dosis de 10.0 μM de la PFD oxidada y sin oxidar, resultó la más interesante en todos los tratamientos, lo que sugiere que si se incrementara la dosis se podrían observar resultados positivos; sin embargo no lo consideramos adecuado, ya que las dosis utilizadas en este trabajo corresponden a las que un ser humano se aplicaría al momento de teñirse, por lo que sería alejarse de la exposición real
- La OFD sin oxidar se comportó como promutágeno en las dosis 0.6 y 1.0 μM , en la cruzada BE
- La OFD oxidada, se comportó como promutágeno en la dosis 0.6 μM , en ambas cruzadas y a 2.0 μM en la cruzada BE, sin encontrar una relación dosis-respuesta
- El efecto genotóxico de la OFD fue mayor que el de la PFD.
- La oxidación de estas aminas produce mayores efectos tóxicos y genotóxicos.
- El efecto genotóxico de la OFD oxidada fue mayor que el de la OFD sin oxidar y éste a su vez fue mayor que el de la PFD oxidada, encontrando la jerarquía siguiente: OFD oxidada > OFD sin oxidar > PFD oxidada > PFD sin oxidar, lo que concuerda con lo reportado previamente en otros bioensayos

10. REFERENCIAS

- Albano, G., Carere, A y Crebelli, R. (1982) Mutagenicity of commercial hair dyes in *Salmonella typhimurium* TA98. *Fd. Chem. Toxicol.*, **20**, 171-175.
- Altekruse, S F, Henley, S J y Thun, M J (1999) Deaths from hematopoietic and other cancers in relation to permanent hair dye use in a large prospective study *Cancer Causes Control*, **10**, 617-625
- Ames, B N, Kammen, H O y Yamasaki, E. (1975) Hair dyes are mutagenic: Identification of a variety of mutagenis ingredients *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **72**, 2423-2427
- Ashraf, W, Dawling, S. y Farrow, L J (1994) Systemic paraphenylenediamine (PPD) poisoning: A case report and review *Hum Exp. Toxicol.*, **13**, 167-170
- Avendaño, L M C. (1993) Introducción a la química farmacéutica. Interamericana McGraw-Hill México pp 157-195
- Batiste-Alentorn, M, Xamena, N, Creus, A. y Marcos, R. (1995) Genotoxicity testing of five compounds in three *Drosophila* short-term somatic assays *Mutat. Res.*, **341**, 161-167
- Beck, H, Bracher, M, Faller, C y Hofer, H. (1993) Comparasion of *in vitro* and *in vivo* skin permeation of hair dyes *Cosmet. Toiletries*, **108**, 76-80, 82-83.
- Benedict, W F. (1976) Morphological transformation and chromosome aberrations produced by two hair dye components *Nature (Lond)* **260**, 368-369
- Bishop, J M (1991) Molecular themes in oncogenesis *Cell*, **64**, 235-248.
- Blair, A, Linos, A, Stewart, P A, Burmeister, L F, Gibson, R, Everett, G, Schuman, L y Cantor, K P. (1992) Comments on occupational and environmental factors in the origin of non-Hodgkin's lymphoma *Cancer Res*, **52**(19 SUPPL), 5501-5502
- Boffetta, P, Andersen, A y Lyngge, E. (1994) Employment as hairdresser and risk of ovarian cancer and non-Hodgkin's lymphomas among women *J Occupational Med*, **36**, 61-65.

Bourquia, A , Jabrane, A J., Ramdani, B. y Zaid, D (1988) Toxicité systemique de la *p*-phenylenediamine. Quatre observations *Presse Med.*, 17, 1798-1800

Brown, I. M , Everett, G D., Burmeister, L F y Blair, A (1992) Hair dye use and multiple myeloma in white men *Am J Public Health*, 82, 1673-1674

Burmaister, F R , Dick, R W , Gibson, y L. Schuman. Hair coloring and risk of cancer. National Institutes of Health, editores. 1994 Feb. 1 (fecha de acceso 3 de julio de 1994). Disponible en: <http://www.organicasajon.com>

Burnett, C M (1978) Percutaneous penetration of 2,4-diaminoanisole. Datos no publicados por Clairol. En: Burnett, C M (1987) Hair-dye safety and toxicology. En, *Cosmetic Safety: A primer for cosmetic scientists*. Ed. By James H Wittam. *Cosmetic Science and Technology series Vol 5* pp. 315-334

Burnett, C M (1987) Hair-dye safety and toxicology. En, *Cosmetic Safety: A primer for cosmetic scientists*. Ed. By James H Wittam. *Cosmetic Science and Technology series Vol 5* pp 315-334

Burnett, C M , Lanman, B , Giovacchini, R , Wolcott, G , Scala, R y Keplinger, M (1975) Long-term toxicity studies on oxidation hair dyes *Fd. Cosmet. Toxicol.* 13, 353.

Burnett, C M , Goldenthal, E I , Harris, S.B., Wazeter, F. X., Strausburg, J., Kapp, R y Voelker, R (1976) Teratology and percutaneous toxicity studies on hair dyes *J. Toxicol. Environ. Hlth.*, 1, 1027.

Burnett, C.M., Loehr, R y Corbett, J (1977) Dominant lethal mutagenicity study on hair dyes *J. Toxicol. Environ. Health*, 2, 657-662

Burnett, C M , Jacobs, M M , Seppala, A. y Shubik, P (1980) Evaluation of the toxicity and carcinogenicity of hair dyes *J Toxicol Environ. Health*, 6, 247-257

Burnett, C M y Goldenthal, E I (1988) Multigeneration reproduction and carcinogenicity studies in sprague-dawley rats exposed topically to oxidative hair-colouring formulations containing *p*-phenylenediamine and other aromatic amines. *Fd. Chem. Toxicol* , 26, 467-474.

Cantor, K.P., Blair, A , Everett, G , VanLier, S , Burmeister, L , Dick, F R., Gibson, R W y Schuman, L (1988) Hair dye use and risk of leukemia and lymphoma *Am J Public Health*, 78, 570-571

Cebulska-Wasilewska, A., Nowak, D., Niedzwiedz, W. y Anderson, D. (1998) Correlations between DNA and cytogenetic damage induced after chemical treatment and radiation. *Mutat. Res.*, **421**, 83-91

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. pp 179-200.

Colditz, G.A. (1994) Hair dye and cancer: Reassuring evidence of no association (editorial comment) *J. Natl. Cancer Inst.*, **86**, 164-165.

Cook, L.S., Malone, K.E., Daling, J.R., Voigt, L.F. y Weiss, N.S. (1999) Hair product use and the risk of breast cancer in young women. *Cancer Causes Control.* **10**, 551-559.

Correa, A., Mohan, A., Jackson, L., Perry, H. y Helzlsouer, K. (2000) Use of hair dyes, hematopoietic neoplasms, and lymphomas: A literature review. I. Leukemias and myelodysplastic syndromes. *Cancer Invest.*, **18**, 366-380.

Cortés-Eslora, J., Gómez-Arroyo, S., Villalobos-Pietrini, R. y Espinosa-Aguirre, J.J. Metabolic activation of three arylamines and two organophosphorus insecticides by coriander (*Coriandrum sativum*) a common edible vegetable. *Toxicol. Lett.*, (en prensa).

Cortinas, C. (1995) Cáncer: herencia y ambiente. La ciencia/ 96 desde México. SEP, FCE y CONACYT. Méx. pp 96

Cote, I.R., Docemeci, M., Rothman, N., Banks, R.B. y Biggar, R.J. (1994) Non-Hodgkin's lymphoma and occupational exposure to hair dyes among people with AIDS. Letter. *Am. J. Public Health (USA)*, **83**, 598-599

Chen, S.C., Wong, I.Y. y Chung, K.T. (1997) Base-pair mutation caused by four nitro-group containing aromatic amines in *Salmonella typhimurium* TA100, TA104, TA4001 and TA4006. *Mutat. Res.*, **395**, 223-227

Chiapella, C., Moreno, J.A., Radovan, R.D., Gaubert, N., y Llagostera, M. (1997) Activation of arylamines to mutagenic product(s) by two *in vitro* plant systems. *Mutat. Res.*, **394**, 45-51

Chiapella, C., Radovan, R.D., Moreno, J.A., Casares, L., Barbé, J. y Llagostera, M. (2000) Plant activation of aromatic amines mediated by cytochromes P450 and flavin-containing monooxygenases. *Mutat. Res.*, **470**, 155-160.

Chung, K.T., Stevens, S.E. Jr. y Cerniglia, C.E. (1992) A review of reduction of azo dyes by intestinal microflora. *Crit. Rev. Microbiol.* **18**, 175-190.

- Chung, K T y Stevens, S E Jr. (1995) Degradation of azo dyes by environmental microorganisms and helminths *Environ. Toxicol. Chem.*, **12**, 2121-2132
- Chung, K T, Murdock, C A, Stevens, S E Jr., Li, Y S., Wei, C.I, Huang, T S y Chou, M W (1995) Mutagenicity and toxicity studies of *p*-phenylenediamine and its derivatives *Toxicol. Lett.*, **81**, 23-32.
- Chung, K T., Murdock, C A., Zhou, Y., Stevens, S E Jr., Li, Y S., Wei, Ch I., Fernando, S Y y Chou, M W. (1996) Effects of the nitro-group on the mutagenicity and toxicity of some benzamines *Environ. Mol. Mutagen.* **27**, 67-74.
- 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.
- Delgado-Rodríguez, A., Ortiz-Marttelo, R., Graf, U., Villalobos-Pietrini, R., y Gómez-Arroyo, S (1995) Genotoxic activity of environmentally important polycyclic aromatic hydrocarbons and their nitro derivatives in the wing spot test of *Drosophila melanogaster*. *Mutat. Res.*, **341**, 235-247
- Demerec, M (1965) *Biology of Drosophila* Hafner Publishing Co. USA., pp 633
- Engler, P. y Strob, U. (1988) Immunoglobulin gene rearrangement. In Kucherlapati, R. and Smith, G R. (eds) *Genetic Recombination*. American Society for Microbiology, Washington, DC, pp 667-700.
- Ferguson, L R., Roberson, A M. y Berriman, J (1990) Direct-acting mutagenic properties of some hair dyes used in New Zealand *Mutat. Res.*, **245**, 41-46
- Frei, H. y Würigler, F E (1988) Statistical methods to decide whether mutagenicity test data from *Drosophila* assays indicate a positive, negative, or inconclusive result. *Mutat. Res.*, **203**, 297-308
- Frei, H. y Würigler, F E (1995) Optimal experimental design and sample size for the statistical evaluation of data from somatic mutation and recombination test (SMART) in *Drosophila*. *Mutat. Res.*, **334**, 247-258
- Friedberg, E. C., Walker, G C y Siede, W. (1995) *DNA repair and mutagenesis* ASM Press, Washington 698 p
- Foye, W.O (1991) *Principios de química farmacéutica* Reverté, S A Barcelona, España pp 95-133.
- Frölich, A y 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



García-Bellido, A. y Merriam, J R (1971) Parameters of the wing imagal disc development of *Drosophila melanogaster*. *Development Biology*, **24**, 61-87.

García-Bellido, A. y Dapena, J. (1974) Induction, detection and characterization of cell differentiation mutants in *Drosophila melanogaster*. *Mutat. Res.*, **128**, 117-130

Gentile, J M , Gentile, G J y Plewa, M J (1986) In vitro activation of chemicals by plants: a comparison of techniques *Mutat. Res.* , **164**, 53-58

Gentile, J M , Gentile, G J y Plewa, M J (1987) Mutagenicity of selected amine derivatives to *Salmonella* following plant activation and mammalian hepatic activation *Mutat. Res.*, **188**, 185-196

Gichner, T , Cabrera-López, G , Wagner, E D y Plewa, M J. (1994) Induction of somatic mutations in *Tradescantia* clone 4430 by three phenylenediamine isomers and the antimutagenic mechanisms of diethyldithiocarbamate and ammonium meta-vanadate. *Mutat Res.* , **306**, 165-172

Gichner, T y Velemínský, 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

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 , Würigler, F E., Katz, A J , Juon, H., Hall, C.B. y Kale, P.G. (1984) Somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Environ. Mutag.*, **6**, 153-188.

Graf, U , Frei, H , Kägi, A., Katz, A J y Würigler, F E (1989) Thirty compounds tested in the *Drosophila* wing spot test. *Mutat. Res.* , **222**, 359-373.

Graf, U y van Schaik, N. (1992) Improved high bioactivation cross for the wing somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Mutat. Res.*, **271**, 59-67

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. 1996. *African Newsletter on Occupational Health and Safety*

- Greiner, F C., Medeiros, L J y Jaffe, E S (1995) Non-Hodgkin's Lymphoma. *Cancer*, **75**(1 SUPPL.), 370-380.
- Grodstein, F, Hennekens, C H, Colditz, G A, Hunter, D J y Stampfer, M J (1994) A prospective study of permanent hair dye use and hematopoietic cancer. *J. Natl. Cancer Inst.*, **86**, 1466-1470
- Guzmán-Rincón, J y Graf, U (1995) *Drosophila melanogaster* somatic mutation and recombination test as a biomonitor. En: *Biomonitoring and Biomarkers as Indicators of Environmental Change: a Handbook*. Editado por F M. Butterworth, L D Corkum and J. Guzmán-Rincón, Plenum Publishing Corp pp 169-181.
- Happle, R (1999) Loss of heterozygosity in the human skin. *J Am Acad Dermatol.*, **41**, 143-161.
- Hardell, L, Moss, A, Osmond, D y Volberding, P (1987) Exposure to hair dyes and polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins in AIDS patients with Kaposi sarcoma: An epidemiological investigation. *Cancer Detect Prev. Suppl.*, **1**, 567-570.
- Herrinton, L J, Weis, N S, Koepsell, T D, Daling, J R, Taylor, J W, Lyon, J L, Swanson, G M y Greenberg, R S (1994) Exposure to hair-coloring products and the risk of multiple myeloma. *Am J Public Health*, **84**, 1142-1144
- Holly, E A., Lele, C y Bracci, P.M (1998) Hair-color products and risk for non-Hodgkin's lymphoma: A population-based study in the San Francisco Bay area. *Am J Public Health*, **88**, 1767-1773
- Howe, G R, Burch, J D, Miller, A B, Cook, G M y Esteve, J (1980) Tobacco use, occupation, coffee, various nutrients, and bladder cancer. *J Natl Cancer Inst.*, **64**, 701-713
- Hurby, R. (1977) The absorption of *p*-toluenediamine by the skin of rats and dogs. *Food Cosmet Toxicol*, **15**, 595-599
- Ido, M, Nagata, C., Kawakami, N, Shimizu, H, Yoshida, Y, Nomura, T y Mizoguchi, H (1996) A case-control study of myelodysplastic syndromes among Japanese men and women. *Leuk. Res.*, **20**, 727-31.
- Inouye, M. y Murakami, U. (1977) Teratogenicity of 2,5-diaminotoluene, a hair-dye constituent, in mice. *Fd. Cosmet. Toxicol.*, **15**, 447-451.
- John, E M, Savitz, D A y Shy, C M (1994) Spontaneous abortions among cosmetologists. *Epidemiology*, **5**, 147-155

- Kerckaert, G.A., LeBoeuf, R A e 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. *Toxicol. Sci.*, **41**, 189-197
- Kiese, M., Ranchor, M y Rauscher, E. (1968) The absorption of some phenylenediamines through the skin of dogs. *Toxicol Applied Pharmacol*, **12**, 495-507.
- Kinkel, H J yHolzmann, S (1973) Study of long-term percutaneous toxicity and carcinogenicity of hair dyes (oxidizing dyes) in rats. *Fd. Cosmet. Toxicol.*, **11**, 641-648
- Kinlen, L J, Harris, R., Garrod, A y Rodríguez, K (1977) Use of hair dyes by patients with breast cancer: A case-control study. *Br. Medical J.*, **2**, 366-368
- Kirkland, D J y Venitt, S (1976) Cytotoxicity of hair colourant constituents: Chromosome damage induced by two nitro-phenylenediamines in cultured Chinese hamster cells. *Mutat. Res.* **40**, 47-56
- Koenig, K L , Pasternack, B S , Shore, R E y Strax, P. (1991) Hair dye use and breast cancer: A case-control study among screening participants. *Am. J Epidemiol*, **133**, 985-995
- Labhahi, M S., Nejari, M y Benomar, S (1998) Intoxication accidentelle d'un nourrisson a la paraphenylenediamine. *Arch. Pédiatrie*, **5**, 1168-1169.
- La-Vecchia, C y Tavani, A (1995) Epidemiological evidence on hair dyes and the risk of cancer in humans. *Eur. J. Cancer Prev*, **4**, 24-43.
- Lawrence, P A (1992) The making of the fly, The genetics of animal design. Blackwell Scientific Publication, U S A
- Lhotka, M A , Plewa, M J y Gentile, J M (1987) Plant activation of *m*-phenylenediamine by tobacco, cotton, and carrot cell suspension cultures. *Environ Mol Mutagen.* **10**, 79-88
- Lifshits, M., Yagupsky, P y Sofer, S (1993) Fatal paraphenylenediamine (hair dye) intoxication in a child resembling Ludwig's angina. *J. Toxicol. Clin Toxicol*, **31**, 653-656
- Maibach, H I y Wolfram, L J (1981) Percutaneous penetration of hair dyes. *J. Soc. Cosmet. Chem.*, **32**, 223-229

- Marshall, S. y Palmer, W S. (1973) Dark urine after hair coloring *J. Am. Med. Ass.*, **226**, 1010.
- Marshall, C J (1991) Tumor suppressor genes *Cell*, **64**, 313-326
- Mele, A., Szklo, M., Visani, G., Stazi, M A., Castelli, G., Pasquini, P. y Mandelli, F. (1994) Hair dye use and other risk factors for leukemia and pre-leukemia: A case-control study Italian Leukemia Study Group. *Am. J. Epidemiol.*, **139**, 609-619
- Merck Index, The (1995) Windholz, M (Editor); Budavari, S., Streumtsos, LY y Noetherfering, M (Co-editores). Publicado por Merck and CO., INC U S A
- Miligi, L., Seniori-Constantini, A., Crosignani, P., Fontana, A., Masala, G., Nanni, O., Ramazzotti, V., Rodella, S., Stagnaro, E., Tumino, R., Vigano, C., Vindigni, C. y Veneis, P. (1999) Occupational, environmental, and life-style factors associated with the risk of hematolymphopoietic malignancies in women *Am. J. Ind. Med.*, **36**, 60-69
- Mitchell, I. y Combes, R. (1984) Mutation test with the fruit fly *Drosophila melanogaster*. Incluido en: Mutagenicity testing: a practical approach Edited by S. Venitt, J.M. Parry, I.R. L. Press, U.K. p. 149-155.
- Nagata, C., Shimizu, H., Hirashima, K., Kakishita, E., Fujimura, K., Niho, Y., Karasawa, M., Oguma, S., Yoshida, Y. y Mizoguchi, H. (1999) Hair dye use and occupational exposure to organic solvents as risk factors for myelodysplastic syndrome *Leuk. Res.*, **23**, 57-62
- Najem, G.R., Louna, D.B., Seebode, J.J., Thind, I.S., Prusakowski, J.M., Ambrose, R.B. y Fernicola, A.R. (1982) Life time occupation, smoking, caffeine, saccharine, hair dyes and bladder carcinogenesis *Int. J. Epidemiol.*, **11**, 212-217.
- 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 exposure to hair dyes. *Ann Epidemiol (UNITED STATES)*, **2**, 577-586
- Nomura, A., Kolonel, L.N. y Yoshizawa, C.N. (1989) A brief original contribution: Smoking, alcohol, occupation, and hair dye use in cancer of the lower urinary tract *Am. J. Epidemiol.*, **130**, 1159-1163
- Oberly, T.J., Bewsey, B.J. y Probst, G.S. (1984) An evaluation of the L5178YTK +/- mouse lymphoma forward mutation assay using 42 chemicals. *Mutat. Res.*, **125**, 291-306

Olshan, A F , Breslow, N.E , Falletta, J.M., Grufferman, S , Pendergrass, I , Robison, L.L., Waskerwitz, M., Woods, W G , Vietti, T J. y Hammond, G D. (1993) Risk factors for Wilms tumor Report from the National Wilms Tumor Study. *Cancer*, 72, 938-944

Osaba, L , Aguirre, A , Alfonso, A y Graf, U. (1999) Genotoxicity testing of six insecticides in two crosses of the *Drosophila* wing spot test *Mutat Res.*, 439, 49-61.

Østerlind, 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. Cancer*, 42, 825-828.

Palmer, K., DeNunzio, A y Green, S. (1976) The mutagenic assay of some hair dye components using the thymidine kinasa locus of L5178Y mouse lymphoma cells. Presented at the 15th Annual Meeting of the Society of Toxicology, Atlanta, Georgia, March 15, 1976.

Pearce, N y Bethwaite, P (1992) Increasing incidence of non-Hodgkin's lymphoma: Occupational and environmental factors *Cancer Res.*, 52(19 SUPPL.), 5496-5500

Peter, J B (1975) Pigmenturia from "Loving Care" hair dye *New Engl. J. Med.*, 293, 458

Picardo, M, Zomopetta, C , Grandinetti, M , Ameglio, F , Santucci, B., Faggioni, A y Passi, S. (1996) Paraphenylenediamine, a contact allergen, induces oxidative stress in normal human keratinocytes in culture. *Br. J. Dermatol.*, 134, 681-685.

Plewa, M J., Wagner, E D y Gentile, J M. (1988) The plant cell/ microbe coinubation assay for the analysis of plant-activated promutagens. *Mutat. Res.*, 197, 207-219

Plewa, M J , Gichner, T., Xin, H., Seo, K Y., Smith, S R. y Wagner, E.D (1993) Biochemical and mutagenic characterization of plant-activated aromatic amines. *Environ. Toxicol Chem.* 12, 1353-1363.

Ramos, P , Abundis, H M , Gaytán, J.C., Ordaz, M.G , Orozco, P G , Maldonado, J , Hernández, J , González, E , Reyes, P , Galicia, E.M y Muñoz, J A. (1993) Manual de laboratorio de Genética para *Drosophila melanogaster* McGraw-Hill, México, p 131.

Redmond, D E J. (1970) Tobacco and cancer: The first clinical report, 1761. *N Engl. J. Med* 282, 18-23

- Rodríguez-Arnaiz, R. y Hernández, A.J (1994) Activity of aromatic amines in the eye: *w/w+* somatic assay of *Drosophila melanogaster* *Environ Mol Mutagen.*, **24**, 75-79.
- Roeleveld, N., Zielhuis, G.A. y Gabreels, F (1993) Mental retardation and parental occupation: A study on the applicability of job exposure matrices *Br. J. Ind. Med.*, **50**, 945-954
- Rojanapo, W., Chutimataewin, S., Kupradinun, P., Tepsuwan, A., Tamyakaset, M., Satitnumkarn, T. (1986a) Carcinogenicity of hair dye used in Thailand *Thai Cancer J*, **12**, 43.
- Rojanapo, W., Kupradinun, P., Tepsuwan, A., Chutimataewin, S. y Tamyakaset, M. (1986b) Carcinogenicity of an oxidation product of *p*-phenylenediamine. *Carcinogenesis*, **7**, 1997.
- Russell, P (1998) Genetics The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc Fifth Edition U S A , pp. 805.
- Saner, C., Weibel, B., Würigler, F.E., y Sengstag, C. (1996) Metabolism of promutagens catalyzed by *Drosophila melanogaster* CYP6A2 enzyme in *Sacharomyces cerevisiae*. *Environ. Mol. Mutagen.*, **27**, 46-58.
- Şardaş, S., Aygün, N. y Karakaya, A.E (1997) Genotoxicity studies on professional hair colorists exposed to oxidation hair dyes. *Mutat. Res.*, **394**, 153-161.
- Searle, C.E., Harden, D.G., Venitt, S. y Gyde, O.H.B (1975) Carcinogenicity and mutagenicity test of some hair colourants and constituents *Nature*, **255**, 506-507
- Sengstag, C.J (1994) The role of mitotic recombination in carcinogenesis. *Crit. Rev. Toxicol.*, **24**, 323-253
- Shahin, M.M (1989) The importance of analyzing structure-activity relationships in mutagenicity studies. *Mutat. Res.*, **221**, 165-180
- Shahin, M.M (1994) Structure-activity relationships within various series of *p*-phenylenediamine derivatives *Mutat. Res.*, **307**, 83-93
- Sharpe, C.R., Collet, J-P., Belzile, E., Hanley, J.A. y Boivin, J.F (2002) The effects of tricyclic antidepressants on breast cancer risk. *Br. J. Cancer*, **86**, 92-97.

- Shelby, M D. y Stassiewicz, S. (1984) Chemicals showing no evidence of carcinogenicity in long-term, two-species rodent studies: the need for short-term test data. *Environ. Mutagen.*, **6**, 871-878.
- Shibata, A , Sasaki, R , Hamajima, N y Aoki, K. (1990) Mortality of hematopoietic disorders and hair dye use among barbers *Acta Haematol Jap.*, **53**, 116-118.
- Shipp, J J (1992) Hair-care products En: Chemistry and technology of the cosmetic and toiletries industry Editado por: D F. Williams y W H Schmitt, Blackie Academic & Professional N Z., U K pp 86-95
- Shore, R E , Pasternack, B S., Thiessen, E. U , Sadow, M y Forges, R. (1979) Case control study of hair dye use and breast cancer *J. Natl Cancer Inst.* , **62**, 277-283
- Sir Hashim, M., Hamza, Y O , Yahia, B , Khogali, F M. y Sulieman, G.I (1992) Poisoning from henna dye and para-phenylenediamine mixtures in children in Khartoum *Ann. Trop. Pediatr.* , **12**, 3-6
- Skov, T , Andersen, A , Malker, H , Pukkala, E , Weiner, J y Lynge, E. (1990) Risk for cancer of the urinary bladder among hairdressers in the nordic countries. *Am. J. Ind. Med.* , **17**, 217-23
- Skov, T y Lynge, E. (1994) Cancer risk exposures to carcinogens in hairdressers *Skin Pharmacol.* , **7**, 94-100
- Soler-Niedziela, L , Shi, X , Nath, J y Ong, T. (1991) Studies on three structurally related phenylenediamines with the mouse micronucleus assay system *Mutat. Res.* , **259**, 43-48
- Sontag J M (1981) Carcinogenicity of substituted-benzene-diaminaes (phenylenediamines) in rats and mice *J. Natl Cancer Inst.* , **66**, 591-602
- Sood, A K , Yadav, S P , Sood, S y Malhotra, R C. (1996) Hair dye poisoning. *J. Assoc. Physicians India*, **44**, 69
- Sood, C., Khan, S y O'Brien, P J (1997) Phenylenediamine induced hepatocyte cytotoxicity redox: Cycling mediated oxidative stress without oxygen activation *Biochim Biophys. Acta*, **1335**, 343-352
- Spanó, M A , Frei, H , Würgler, F E y Graf, U. (2001) Recombinogenic activity of four compounds in the standard and high bioactivation crosses of *Drosophila melanogaster* in the wing spot test *Mutagenesis*, **16**, 385-394

- Spitz, M.R., Fueger, J.J., Goepfert, H. y Newell, G.R. (1990) Salivary gland cancer. A case-control investigation of risk factors *Arch. Otolaryngol Head Neck Surg*, **116**, 63-66.
- Stavraky, K.M., Clarke, E.A. y Donner, A. (1979) Case control study of hair dye use by patients with breast cancer and endometrial cancer. *J. Natl. Cancer Inst.*, **63**, 941-945.
- Stenback, F.G., Rowland, J.C. y Russell, L.A. (1977) Non-carcinogenicity of hair dyes: Lifetime percutaneous applications in mice and rabbits. *Fd. Cosmet. Toxicol.*, **15**, 601-606
- Sullivan, J.W. (1982) Epidemiological survey of bladder cancer in greater New Orleans. *J. Urol.*, **128**, 281-283.
- Suzuki, J., Koyama, I. y Suzuki, S. (1983) Mutagenicities of mono-nitrobenzene derivatives in the presence of norharman. *Mutat. Res.*, **120**, 105-110
- Thun, M.J., Altekruse, S.F., Namboodiri, M.M., Calle, E.E., Myers, D.G. y Heath, C.W. Jr. (1994) Hair dye use and risk of fatal cancers in U.S. women. *J. Natl. Cancer Inst.*, **86**, 210-215.
- Izonou, A., Polychronopoulou, A., Hsiesh, C.C., Rebelakos, 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**, 408-410
- Vega, G.S. (1988) Evaluación epidemiológica de riesgos causados por agentes químicos ambientales. Limusa. México, D.F.
- Venitt, S., Searle, C.E., Harnden, D.G. y Gyde, O.H.B. (1975) Carcinogenicity and mutagenicity test on some hair colourants and constituents. *Nature (Lond.)* **225**, 506-507
- Venitt, S. y Searle, C.E. (1976) Mutagenicity and possible carcinogenicity of hair colourants and constituents. IARC Scientific Publ. No. 13, INSEREM, vol. 52, pp 263-273.
- Vogel, E.W. (1991) Genotoxic chemicals. An introduction into basic principles of genetic toxicology. Apuntes del Primer Taller Latinoamericano en Genética Toxicológica en *Drosophila melanogaster*. Tlaxcala, Méx. Sin publicar
- Vogel, E.W., Graf, U., Frei, H.J. y Nivard, M.M. (1999) The results of assays in *Drosophila* as indicators of exposure to carcinogens. *IARC. Scient. Publ.*, **146**, 427-470

- Wagner, E D , Cebulka-Wasilewska, A , Connolly, S y Plewa M.J. (1996) Mutagenic analysis of 2,3-diaminophenazine and 2-amino-3-hydroxyphenazine in *Salmonella* strains expressing different levels of *O*-acetyltransferase with and without plant and mammalian activation *Mutat. Res.*, **372**, 65-74
- Wang, L.L , Li, S L., 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 *Biomed. Environ. Sci.*, **4**, 310-316
- Watanabe, T , Hirayama, T y Fukui, S (1989) Phenazine derivatives as the mutagenic reaction product from *o*- or *m*-phenylenediamine derivatives with hydrogen peroxide. *Mutat. Res.*, **227**, 35-45
- Watanabe, T , Hirayama, T y Fukui, S (1990) Mutagenicity of commercial hair dyes and detection of 2,7-diaminophenazine. *Mutat. Res.*, **244**, 303-308
- Wernick, T., Lanman, B.M y Fraux, J.L. (1975) Chronic toxicity, teratologic, and reproduction studies with hair dyes *Toxic. Appl. Pharmac.* **32**, 450.
- Wild, D., King, M.I. y Eckhardt, K (1980) Cytogenetic effect of ortho-phenylenediamine in the mouse, chinese hamster, and guinea pig and of derivatives, evaluated by the micronucleus test *Arch. Toxicol.*, **43**, 249-255
- Wilson, P D , Loffredo, C A., Correa-Villaseñor, A. y Ferencz, C (1998) Attributable fraction for cardiac malformations. *Am. J. Epidemiol.*, **148**, 414-423.
- Xiao, L Z e Ichikawa, S (1998) Mutagenic interactions between X-rays and two promutagens, *o*-phenylenediamine and *N*-nitrosodimethylamine, in the stamen hairs of *Tradescantia* clone BNL 4430 *Mutat. Res.*, **413**, 177-186.
- Yagi, H., el-Hendi, A M , Diab, A y Elshikh, A A (1996) Paraphenylenediamine induced optic atrophy following hair dye poisoning. *Hum. Exp. Toxicol.*, **15**, 617-618
- Zahn, S.H., Weisenburger, D D., Babbitt, P A., Saal, R C., Vaught, J.B. y Blair, A (1992) Use of hair coloring products and the risk of lymphoma, multiple myeloma, and chronic lymphocytic leukemia. *Am. J. Public Health*, **82**, 990-997
- Zito, R (1982) Mutagenicity of commercial hair dyes in *Salmonella typhimurium* TA98 *Fd. Chem. Toxic.*, **20**, 171-175

ESTA TESIS NO SALI
DE LA BIBLIOTECA