

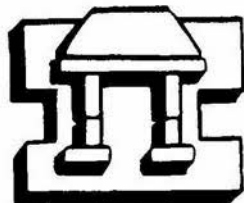


UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
IZTACALA

VALORACION DE LA GENOTOXICIDAD DEL ACIDO
CAFEICO EN LA CRUZA BIOACTIVACION ELEVADA
(B.E.) DE *Drosophila melanogaster* EN LA PRUEBA
S.M.A.R.T.

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
B I O L O G O
P R E S E N T A :
JESUS CLEMENTE OJEDA DUPLANCHER



IZTACALA

DIRECTORA DE TES:S: BIOL. LAURA CASTAÑEDA PARTIDA

LOS REYES IZTACALA EDO. DE MEXICO.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



U.N.A.M. CAMPUS

IN MEMORIAM

SALVADOR DUPLANCHER, ALTAGRACIA CASTAÑEDA,

MANUEL OJEDA,

Y HERMANOS.....EN DONDE QUIERA QUE
ESTÉN.....

Laboratorio de Geografía Teológica, FES, IZTACALA,

JESUCRISTO, TE DOY LAS GRACIAS POR ESTA OPORTUNIDAD QUE ME DAS DE VIVIR.

JESUS Y TERE, GRACIAS POR SUS DESVELOS, REGAÑOS, PACIENCIA, CONSEJOS, Y QUE MAS LES PUDO DECIR, POR LA OPORTUNIDAD DE CRECER COMO PERSONA, SIEMPRE ESTAN EN MIS PENSAMIENTOS. LOS AMO CON TODO MI CORAZON.

ABUELA LUPITA, TE QUIERO MUCHO.

TIA CARMEN, GRACIAS POR TU APOYO, CARIÑO Y CUIDADOS EN MOMENTOS DIFICILES, TE ADORO.

TIO JAVIER, ME ENSEÑASTE QUE NO IMPORTAN LOS OBSTACULOS, UNO TIENE QUE SEGUIR ADELANTE. A NO TIRAR LA TOALLA, TE QUIERO MUCHO.

LAURA, CLARA, IVONNE, GRACIAS POR ESTAR EN MOMENTO DIFICILES Y AHORA EN UN MOMENTO MUY FELIZ EN MI VIDA, POR SER MIS AMIGAS.

PROFESORAS LAURA, MARU E IRMA, POR ENSEÑARME LO QUE SIGNIFICA SER AMIGOS Y TENDER LA MANO EN SITUACIONES COMPLICADAS, POR SU APOYO, SOLIDARIDAD Y MAS COSAS QUE NO SE APREDEN EN LAS CLASES, SINO CON EL TRATO DIARIO. GRACIAS POR SOPORTARME.

A MIS QUERIDAS AMIGAS Y COMPAÑERAS DE TRABAJO LILLIAN ARAIZA A. Y LAURA ARAIZA A. LILLIAN, ERES MUY ESPECIAL, CONTIGO HE PASADO MUCHAS COSAS Y...TE QUIERO MUCHO, ERES UNA GRAN PERSONA, COMO TU NO HAY MAS. GRACIAS POR TU AMISTAD.

J.C. OJEDA DUPLANCHER

Laboratorio de Genética Toxicológica, FES, IZTACALA.

LINDA TU SIEMPRE ESTUVISTE CONMIGO DURANTE TODA LA CARRERA, GRACIAS POR SER COMO ERES. SIEMPRE DISPUESTA A ESCUCHARME Y DARME PALABRAS DE ALIENTO. TU ERES INDISPENSABLE EN MI VIDA.

SARI, ERES UNA NIÑA MUY BUENA ONDA, QUE BUENO QUE TE CONOCÍ. NO IMPORTA QUE ME HAGAS BURLA DE LOS CONTEOS, YO TE DIGO QUE EL MOULIN ROUGE, VA A SER INVOLVIDABLE. ME EQUIVOCO?

IVETH, ERES MUY ESPECIAL PARA MI, AUNQUE ERES MUY FRESA, PERO NO IMPORTA NADIE ES PERFECTO, TENIAS QUE TENER ALGUN DEFECTO.

CESAR H. H., NOS LA PASAMOS MUY BIEN DURANTE LAS PRACTICAS, NO? CUANDO VEAS AL CANIBAL SALUDOS.

MAGDA, MIRIAM, LAS NORMAS, PATTY, JENNY, SONIA, DOÑA SUSY, SIEMPRE ESTUVIERON A MI LADO Y ME DIERON ANIMO PARA CONTINUAR ADELANTE, NO HAY NI COMO AGRADECERLO.

Y A TODOS MIS AMIGOS Y AMIGAS, QUE YA NO MENCIONO. LAMENTO YA NO INCLUIRLOS, PERO TIENE UN LUGAR ESPECIAL.

MARCELA, EN DONDES ESTES..... GRACIAS...

J.C. OJEDA DUPLANCHER.

	Pág.
RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	2
• Piel, filtro solar y ácido cafeico	4
• Radicales libres de oxígeno	7
• Ensayo S.M.A.R.T.	8
◊ Modelo biológico	8
◊ Marco teórico	9
ANTECEDENTES	16
JUSTIFICACIÓN	20
OBJETIVO	20
HIPÓTESIS	20
MATERIALES Y MÉTODO	21
• Ensayo de manchas en el ala	21
• Químicos	23

	Pág.
RESULTADOS	24
DISCUSIÓN	26
CONCLUSIÓN	27
ANEXO 1	28
LITERATURA CITADA	29

RESUMEN.

En el presente trabajo se valoró el efecto genotóxico del ácido cafeico (AC), usando la prueba S.M.A.R.T. (por sus siglas en inglés : Somatic Mutation and Recombination Test; en español: Prueba de Mutación y Recombinación Somáticas) del ala en *Drosophila melanogaster*, en la cruce de Bioactivación Elevada (B.E.). El AC ha sido reportado como un mutágeno por la International Agency for Research on Cancer (IARC), al realizarse estudios con ratones se ha demostrado que provoca una alta incidencia de cáncer en estómago y riñón. Hirose *et al.*, en un estudio realizado con varios antioxidantes y en combinación demostraron que el AC solo, incrementa el cáncer de estómago. Duarte *et al.*, al utilizar la prueba de Ames y poner la fracción S9, obtuvo una alta actividad genotóxica. La cruce de B.E. se hace utilizando hembras vírgenes de la línea mutante Oregon-flare *ORR(1)*; *ORR(2): fir³/TM3,Br⁶* y machos de la línea mutante *mwh/mwh* lo cual permite activar promutágenos. Los individuos producto de esta cruce presentan en los cromosomas 1 y 2 los genes del Citocromo P450 de la línea Oregon-flare, los cuales están sobreexpresados de tal manera que hay una capacidad de Bioactivación elevada y esto permite valorar *in vivo* el posible riesgo genotóxico de diversos químicos. Se expusieron larvas de la cruce B.E. de 72 ± 4 hrs. a distintas dosis de AC (27 mM, 81 mM, 135 mM) en tratamiento crónico hasta que emergieron los adultos. El testigo positivo fue el promutágeno uretano (20 mM). En el presente estudio se encontró que el AC no es mutagénico, ya que la frecuencia de manchas por individuo es similar a la del testigo negativo (agua), por lo que se puede afirmar que para la cruce B.E. de la prueba S.M.A.R.T. el AC no es mutagénico a estas concentraciones.

INTRODUCCIÓN

El desarrollo de productos químicos naturales y sintéticos en los campos farmacéutico, industrial, agrícola y cosmetológico, entre otros, generan compuestos que al estar en contacto con el hombre pueden provocar efectos tóxicos, genotóxicos o cancerígenos a corto, mediano o largo plazo. (Loomis, 1982 citado en Rangel, 2001). La genética toxicológica se encarga de analizar el efecto de un compuesto sobre el material hereditario, tratando de comprender los eventos que ocurren desde la interacción del ADN con el agente químico, hasta la expresión fenotípica del daño (Vogel, 1991).

Es sabido que muchos compuestos extraños (xenobióticos) penetran por diversas vías al organismo y algunos de ellos (promutágenos) necesitan ser activados por determinadas enzimas de la familia del Citocromo P450 (CIT450) y podrían en algún momento ocasionar mutaciones (Fig. 1 y Tabla 1)(Gómez-Arroyo, 1994; Styles *et al.*, 1994; Smith y White, 1995, citados en Sánchez, 2001).

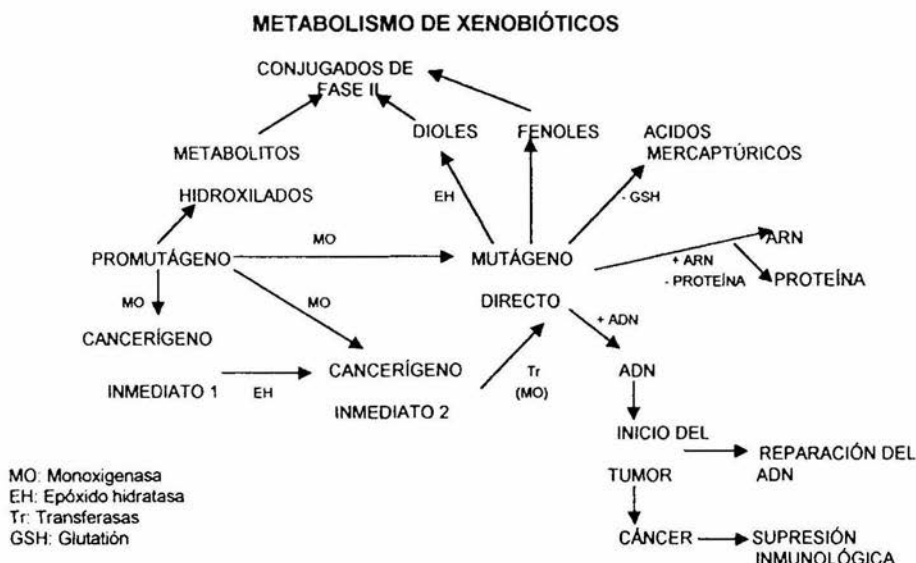


Fig. 1. Se muestran las diferentes rutas que puede seguir el metabolismo de un xenobiótico, observando las reacciones de óxido - reducción (Fase I) y de conjugación (Fase II). Las flechas en color azul indican las vías mediante las cuales el compuesto puede ser eliminado sin ocasionar ningún daño en el organismo. Las flechas en color rojo indican como el metabolismo participa en la activación de algún xenobiótico provocando efectos tóxicos o genotóxicos en el organismo (Foye, 1991, citado en Rangel, 2001)

Las enzimas que forman parte del Citocromo P450 (CYT450) están presentes en el pulmón, bazo, riñón, algunos tejidos embrionarios e hígado de algunos animales, como rata, ratón, hámster y el ser humano (Vogel, 1991) además de insectos y vegetales. Son las encargadas de oxidar, reducir o hidrolizar a los compuestos xenobióticos (van Iersel, et al., 1999)

Tabla 1. Enzimas involucradas en el metabolismo de xenobióticos (Wolf, 1990)

No. de genes	Abreviación común	Enzimas	Productos de reacciones	Detectadas en
>30	CYT450	Citocromo P450s	Oxidación del C, N y S	Microsomas
1		Citocromo P450 reductasa	Reducción de un electrón	Microsomas
1	QR	Quinona reductasa	Reducción de quinonas	Citosol
>10	GST	Glutatio S-Transferasa	Conjugación de moléculas electrofílicas con glutatión	Citosol y microsomas
1	EH	Epóxido hidrolasa	Hidratación de epóxidos	Citosol y microsomas
>5	UDPGT	UDP glucoronil transferasa	Conjugación de ácido glucurónico con -OH, -NH	Microsomas
>2	SULT	Sulfotransferasa	Conjugación de SO ₃ a -OH, -NH	Citosol
>2	NAT	N, O- acetil transferasa	Transfere acetyl a -NH, -OH	Citosol

PIEL, FILTRO SOLAR Y ÁCIDO CAFEICO.

La piel es el órgano más grande del cuerpo, está compuesta de una gran variedad de tipos celulares, su principal función es delimitar el medio interno de los seres vivos y protegerlo del ambiente externo (Russell, 1992), debido a lo cual sirve como barrera de protección contra el ataque de microorganismos y factores ambientales físicos y químicos (Jürgen, 1992). Presenta una estructura compleja formada por diferentes capas: las cuales son la epidermis, dermis (dermis reticular) e hipodermis. La epidermis es una capa de epitelio estratificado que está conectada al tejido conjuntivo (dermis); ésta se encuentra encima de una base de tejido adiposo que forma la hipodermis (Leeson, *et al.*, 1989; Russell, 1992).

Uno de los principales factores ambientales a los que está expuesta la piel es la luz solar, la cual se divide en ultravioleta, luz visible, infrarrojo y onda corta (Madhukar, A., 1992).

La luz ultravioleta (UV) se divide en: UV-A (320-400 nm), UV-B (280 a 320 nm) y UV-C (280 nm) (Larson, R., 1988). La región UV-A (320 nm), causa la pigmentación excesiva de la piel o melanogénesis, la UV-B provoca eritema, quemaduras de piel, también estimula la pigmentación y el edema. La radiación UV-C es absorbida por la capa de ozono en la atmósfera por lo que no incide en la superficie terrestre, sin embargo hay lámparas comerciales que tienen esta longitud de onda, las cuales se emplean como germicidas (Freeman, *et al.*, 1989).

Las dosis excesivas de UV-A y UV-B tienen efectos nocivos dependiendo de la latitud, altitud geográfica, el transcurso del día y la capa de ozono (Larson, 1988). Las pérdidas del ozono estratosférico son del 1%, lo que aumenta hasta un 2% la radiación UV-B a la superficie de la Tierra, con un consecuente incremento en el riesgo de carcinomas cutáneos. (Freeman, *et al.*, 1989; Fernández, 1994). Sin embargo, la radiación UV-B tiene una gran importancia para el ser humano ya que promueve la síntesis de vitamina D y su falta puede inducir un metabolismo anormal de calcio, fósforo y raquitismo (Madhukar, 1992).

La piel humana tiene diversos mecanismos que le permiten impedir los daños causados por la radiación UV: a) Queratinización. Se forma el estrato córneo de la piel, el cual contiene proteínas que absorben la luz UV. b) Pigmentación. Se secreta melanina por los melanocitos, en la epidermis adquiriendo el bronceado. c) Acumulamiento de carotenoides. En la epidermis y la hipodermis, se acumulan los carotenos, los cuales actúan como estabilizadores de membranas y como antioxidantes. d) Superóxido dismutasa y peroxidoreductasa. Disminuyen el efecto de la radiación UV eliminando radicales libres. e) Mecanismos de reparación del ADN. Eliminan el daño causado al ADN por la radiación, disminuyendo el riesgo de cáncer (Madhukar, A., 1992).

A pesar de los mecanismos mencionados la piel humana está sujeta a la exposición de la radiación UV, la cual se ha relacionado con diversas enfermedades que van desde la formación de eritema (enrojecimiento), melanogénesis, envejecimiento prematuro hasta cáncer de piel (Freeman, *et al.*, 1989)

Para prevenir o reducir los efectos nocivos de la radiación UV, es necesario tomar medidas fotoprotectoras, como evitar la exposición prolongada, favorecer el bronceado natural con exposiciones cortas o suberitemogénicas (formadoras de eritema), administrar productos químicos que aumenten las defensas naturales de la piel y el empleo de filtros solares, que pueden ser:

- a) Físicos (también llamados bloqueadores solares).- estas sustancias no absorben la luz, reflejan la radiación UV y la visible. Normalmente son sustancias con color, opacas, que se adhieren a la piel y no se caen después de nadar. No son aceptados cosméticamente, pero son apropiados para pacientes que son muy sensibles a la radiación UV y a la visible o para personas que por su trabajo se exponen mucho tiempo al sol.
- b) Químicos.- son preparaciones incoloras, las cuales se colocan sobre la piel, normalmente contienen compuestos que absorben luz de 290 a 400 nm, modificando las propiedades ópticas de la piel. Previenen las reacciones fotoquímicas y bioquímicas responsables de la inducción de quemaduras solares, además protegen del envejecimiento prematuro (García, 1998).

El empleo de las plantas medicinales con fines curativos es una práctica que se ha utilizado desde tiempo inmemorial. Durante mucho tiempo los remedios naturales, y sobre todo de las plantas medicinales fueron el principal e incluso el único recurso de que se disponía. Esto hizo que se profundizara en el conocimiento de las especies vegetales que poseen propiedades útiles al hombre, y ampliar el conocimiento para el empleo de los principios activos que se extraen de ellas. (Martín, 2001)

Muchas de las especies vegetales utilizadas por sus virtudes curativas entre los antiguos egipcios, griegos, romanos, hindúes y chinos, pasaron a formar parte de la farmacopea medieval, que más tarde se vio enriquecida con las plantas del Nuevo Mundo. Dichas plantas medicinales y los remedios que entonces se utilizaban se siguen usando hoy en día (Martín, 2001). De hecho hay un resurgimiento del uso de productos extraídos de plantas (Kaur, et al., 1998).

El género *Buddleja* escordioideas, tiene una amplia distribución en las zonas áridas de México, desde Chihuahua hasta el suroeste de Hidalgo, habitando además zonas desérticas de los Estados Unidos. En los estados del norte del país se le conoce con el nombre de "escobilla". *B. escordioideas*, es un arbusto de 30 cm a un metro de altura, ramoso y de tallo leñoso, sus hojas son sésiles pequeñas con margen crenado y con venación muy conspicua en el envés. Presenta inflorescencia terminal con varios pares de cimas capitadas colocadas en axilas florales, con cabezuelas sésiles. Esta planta es utilizada artesanalmente para fabricar escobas, el cocimiento de sus hojas se utiliza contra la indigestión (IMSS, 1994; Rzedowski, 1985).

B. escordioideas, se utiliza de manera empírica como protector solar en el Estado de San Luis Potosí (Ávila, 1999). *B. escordioideas*, tiene un principio activo conocido como verbascósido (Fig. 2): es un compuesto fenilpropanoico, constituido por dos moléculas de azúcares enlazados por uniones éster, además se observan anillos aromáticos (Ávila, 1999). Sin embargo, la piel puede absorber el verbascósido y llegar a hidrolizarlo (Ávila, com. per.), ya que en las células existen enzimas de la clase hidrolasas, cuya función es la transferencia de grupos funcionales al agua y en el caso del verbascósido, éste presenta un enlace éster el cual es el sustrato en el cual la hidrolasa del tipo

esterasa, actúa y es la vía por la que posiblemente el verbascósido es hidrolizado (Lehninger, 1981) en dos moléculas: una es el 2 (3,4 dihidroxifenil) etanol y la otra es el ácido caféico (Fig. 3). El ácido caféico tiene un peso molecular de 180.2 g/mol y su fórmula es $C_9H_8O_4$ (oxiresearch,2000).

El ácido caféico es uno de los principales compuestos dentro de la familia de los ácidos fenólicos orgánicos, y un principio activo de origen vegetal de potente actividad biológica, se puede encontrar en alimentos como lechuga, ciruela, pera, manzana, papa, apio, café, solo por citar algunos (Arnes y Swirsky, 1999). Las investigaciones científicas de los últimos años, han determinado que posee las siguientes propiedades: efecto antiapoptótico sobre las células endoteliales, es decir, un efecto que detiene la muerte de las células que tapizan el sistema circulatorio (citoprotección). Actividad antioxidante, resulta un potente protector de los tejidos frente al daño de radicales libres. Protección del colágeno y de la elastina, condición básica para regenerar la piel a partir de heridas, úlceras o quemaduras. Inhibición de prostaglandinas proinflamatorias, en especial sobre las que originan inflamaciones crónicas. Efecto antihistamínico. Efecto preventivo y curativo cuando se origina un proceso conocido como estrés oxidativo (Podolsky, 2000).

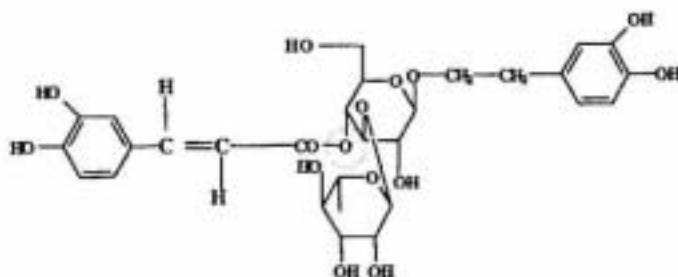


Fig. 2. Molécula de verbascósido, en la línea roja se marca el enlace éster, el cual es hidrolizado por una esterasa.

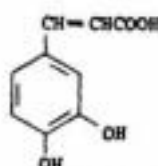


Fig. 3 Molécula de ácido cafeico.

RADICALES LIBRES DE OXÍGENO.

Los radicales de oxígeno tienen la capacidad de dañar reversible o irreversiblemente compuestos pertenecientes a todas las clases bioquímicas, incluyendo ácidos nucleicos (ADN y ARN), proteínas y aminoácidos libres, lípidos y lipoproteínas, carbohidratos y macromoléculas del tejido conjuntivo; estas alteraciones pueden tener impacto sobre el funcionamiento celular, como el metabolismo y la expresión genética (Gerschman, *et al.*, 1954).

Modifican la estructura de algunos aminoácidos por lo que pierden su actividad biológica. En las proteínas se pierden los enlaces disulfuro, por lo que son más susceptibles a la proteólisis perdiendo su función. En lo referente a la interacción con el ácido desoxirribonucleico (ADN) cambian su estructura, formando dímeros de pirimidina, metilación de bases lo que afecta la regulación en la expresión de ciertos genes. Con los lípidos se lleva a cabo la lipoperoxidación, lo cual altera a las membranas celulares produciendo lisis (Larson, 1988).

En la última década se ha obtenido amplia evidencia que indica que los radicales de oxígeno tienen que ver en el desarrollo de muchas enfermedades, como el cáncer y enfermedades cardiovasculares y cerebrovasculares, por ocasionar daño oxidativo a proteínas, lípidos y ácidos nucleicos. En la piel la radiación solar produce radicales libres que intervienen en las lesiones por esta, es por esto la importancia de los antioxidantes ya que neutralizan la acción de los radicales libres, desempeñando una función fundamental en la prevención o disminución de los procesos de enfermedades como el cáncer, enfermedades del corazón y en el envejecimiento del ser humano, dada su capacidad de proteger a las macromoléculas biológicas contra el daño oxidativo (Athar, *et al.*, 1992; Beindic, 1994; Pineda, *et al.*, 1999; Cháves, *et al.*, 2000).

Entre los antioxidantes más conocidos figuran los tocoferoles, el ácido ascórbico, los flavonoides como quercetina, robinulina, luteolina, kaempferol, naringenina, catequinas, etc.; las antocianinas, los caretonoides, ácidos fenólicos como ácido cafeico, ferúlico, gálico, clorogénico (Larson, 1997)

ENSAYO S. M. A. R. T.

• Modelo Biológico.

La mosca del vinagre *Drosophila melanogaster*, ha probado ser un organismo experimental muy valioso: cultivo fácil y barato, cientos de individuos por generación, ciclo de vida corto, composición genética de sólo cuatro pares de cromosomas totalmente mapeados y gigantes en las células de las glándulas salivales (CSM, 1998).

El ciclo de vida es de 9 a 10 días a 25° C, presentando diferentes estadios o etapas de desarrollo ontogénico: huevo, larva, pupa y adulto o imago (Figs. 4 y 5; Tabla 2) (Ramos, et al., 1993).

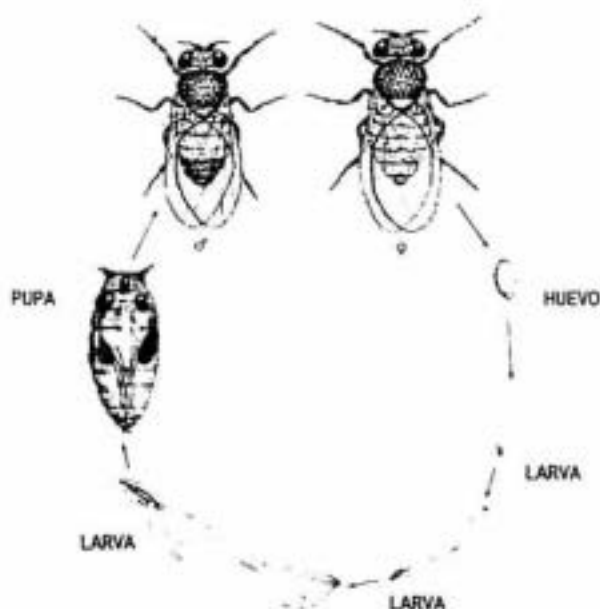


Fig. 4. Ciclo de vida de *Drosophila melanogaster*. Tiene un ciclo de vida corto al cual pasa por los siguientes estadios o etapas: huevo, larva de primer estadio (24 hrs.), larva de segundo estadio (48 hrs.), larva de tercer estadio (72 hrs.), pupa (120 hrs.) emergencia de imago o adulto 120 hrs. después de la oviposición.

Tabla 2. - Características fenotípicas entre machos y hembras de *Drosophila melanogaster* (CSM, 1998)

Hembras	Machos
Más grandes	Más pequeños
El abdomen acaba en forma de punta	El abdomen acaba en forma redonda
Todos los anillos (bandas) están separados, hasta el final del abdomen	Al final del abdomen se ve un anillo grueso
No tienen pelos en el primer par de patas	Tienen un peine sexual en el primer par de patas

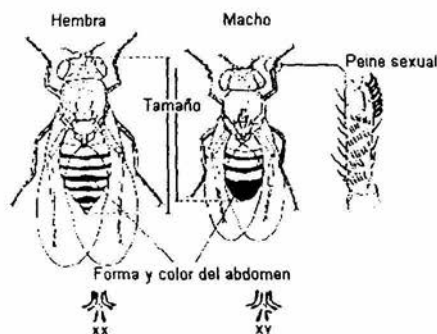


Fig. 5. Diferencias anatómicas entre hembras y machos de *Drosophila melanogaster*. (csm, 1998).



- Marco Teórico.

IZT.

La prueba S.M.A.R.T (por sus siglas en inglés Somatic Mutation And Recombination Test; en español: Prueba de Recombinación y Mutación Somáticas), fue desarrollada por Graf, *et al.*, (1984) para detectar de manera rápida y económica agentes genotóxicos; es una prueba *in vivo* en células somáticas de un eucariote pluricelular, que utiliza como modelo biológico a la mosca del vinagre *Drosophila melanogaster* (Fig. 6) (Guzmán-Rincón y Graf, 1995).



Fig. 6. *Drosophila melanogaster*.

La prueba S.M.A.R.T. utiliza marcadores fenotípicos en las células que dan origen a los tricomas (pelos) de las alas. Tiene como fundamento la pérdida de heterocigosidad de genes marcadores, debido a eventos genéticos tales como: no disyunción, delección, mutación puntual y recombinación mitótica provocadas por un agente químico o físico, en las células de los discos imagales de las larvas (Figs. 7a y 7b), los cuales son sacos epiteliales de alrededor de 50 células que después se dividen por mitosis y dan origen a estructuras tales como las alas, antenas, ojos. Si se exponen a un agente genotóxico, las células sufrirán eventos genéticos de mutación o recombinación mitótica, que se expresarán en el ala como clones o manchas que pueden ser sencillas, (pequeñas o grandes) o gemelas (grandes o pequeñas) (Fig. 8). Al diferenciarse, cada célula del disco imagal del ala da origen a un tricoma, que se forma por la acumulación de fibras de actina en un polo de la célula; el tricoma crece durante la metamorfosis y posterior a ésta la célula muere y sólo es observable la presencia del tricoma en la superficie de las alas. De esta manera puede establecerse una relación directa entre el número de tricomas en los distintos sectores del ala y el número de células que los forman. Al exponer a las larvas a un agente sospechoso, si hay daño en el material genético, se puede determinar mediante métodos estadísticos, al comparar la frecuencia y el tamaño de manchas en los organismos expuestos, con la obtenida en organismos no expuestos. (Demerec, 1965; Garcia-Bellido y Merriam, 1971; Garcia-Bellido y Dapena, 1974; Graf, et al., 1984; Frei y Würzler, 1995).

DISTRIBUCIÓN DE LOS DISCOS IMAGALES EN LA LARVA

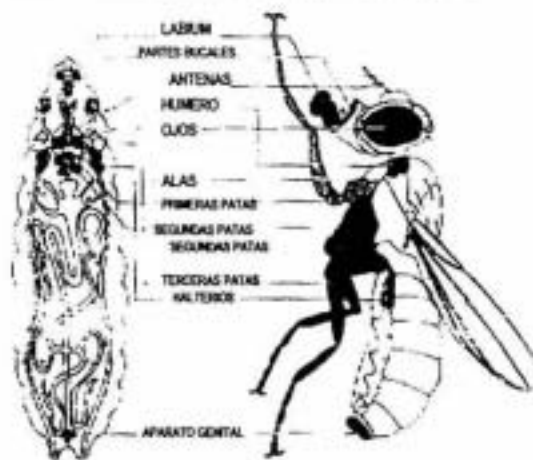


Fig. 76. Distribución de los discos imagales en *Drosophila melanogaster*



Fig. 79. Disco imagal del ala de *D. melanogaster* (Fylwite, Indiana, 1999)

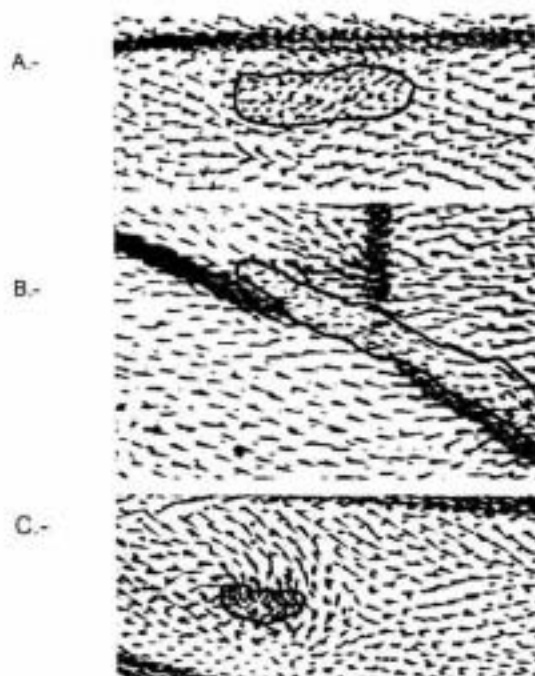


Fig. 8. Tipos de manchas en el ala A.- *mwh*; B.- *genetic*; C.- *flare*

La prueba del ala de S.M.A.R.T., utiliza tres líneas: *multiple wing hair (mwh/mwh)*, *flare (flr3/TM3, Bd^r)* y *Oregon-flare (ORR(1); ORR(2); flr³/TM3, Bd^r)*.

- Línea *mwh*: Mutación recesiva localizada en el brazo izquierdo del cromosoma 3 (3-0.3). Su expresión fenotípica se observa como un cambio del número de tricomas por célula (3-5), mientras que en el fenotipo silvestre a cada célula le corresponde un tricoma.
- Línea *flr³* (*flare*): Son tricomas mal formados, cortos en forma de flama o roseta de maíz. Es una mutación recesiva y está localizada en el brazo izquierdo del cromosoma tres pero en posición próxima anterior (3-38.8). Esta mutación en homocigosis es letal (Ramos, *et al.*, 1993). Sin

embargo, las células individuales homocigóticas en los discos imagales de las alas son viables y pueden producir clones mutantes en las células de las alas del adulto. (Graf, et al., 1984 y 1996).

- Línea Bd^d (serrata): Para reconocer fenotípicamente a las líneas flare y Oregon-flare, se utiliza este marcador dominante, que se manifiesta como muescas en los bordes de las alas; en condiciones de homocigosis también es letal. Se localiza en el cromosoma 3 (3-92.5) (Ramos, et al., 1993).
- TM3 (inversión TM3): Como los marcadores flr^2 y Bd^d son letales en homocigosis la línea presenta un cromosoma balanceador con inversiones múltiples (TM3), lo cual permite mantener la línea, ya que sólo se recuperan los individuos viables, la cual está formada por individuos heterocigóticos para los marcadores letales (Graf, et al., 1996).
- Línea $ORR(1)$; $ORR(2)$ (Oregon) La línea Oregon-flare fue construida por Frölich y Würigler en 1989. Esta línea presenta el cromosoma 2 de la línea $OR(R)$ resistente al DDT (Dapkus y Morell, 1997 citado en Graf y Schaik 1992 y Delgado Rodríguez, et al., 1995). Este cromosoma a su vez acarrea la mutación dominante $Rst(2)$ DDT ubicada en (2-656) la cual confiere no solo la resistencia al DDT e insecticidas organofosforados en larvas y adultos sino también el incremento general en el metabolismo xenobiótico (Lindsley & Zimm, 1992 citado en Delgado-Rodríguez et al., 1995). Esta mutación es responsable de incrementar de manera constitutiva los niveles del Citocromo P450, complejo enzimático que participa activamente en la oxidación y reducción metabólica de diferentes compuestos inactivando o activando promutágenos. (Graf y Schaik, 1992 y Delgado-Rodríguez, et al., 1995).

Las cruas empleadas para la prueba S.M.A.R.T. del ala, son Estándar (E): flr^2 / TM3, Bd^d X mwh / mwh y Bioactivación Elevada (B.E.) utiliza la crua $ORR(1)$; $ORR(2)$; flr^2 / TM3, Bd^d X mwh / mwh . Se utiliza para valorar *in vivo* el efecto de activación de promutágenos por acción del metabolismo dependiente del CYP450. Las larvas transheterocigotas resultantes de las cruas poseen uno de los marcadores recesivos (mwh) en el cromosoma 3 y el otro marcador (flr^2) en su homólogo (Fig. 9a). Ambas cruas producen también larvas heterocigotas para mwh y su genotipo en la crua B.E. es $ORR(1)$; $ORR(2)$; mwh / $TM3Bd^d$ y para la crua E el genotipo es mwh / $TM3Bd^d$. Su fenotipo es Serrata (muescas en el borde del ala) (Ramos et al., 1993). La inversión múltiple TM3 impide la recombinación entre los homólogos del cromosoma portador, por lo que los manchas que se tengan siempre serán sencillas debido únicamente a mutaciones, lo cual sirve para conocer por diferencia la frecuencia de recombinación (Graf, et al., 1984 y 1998)

Los individuos resultado de estas cruas presentan dos genotipos:

Fenotipo Silvestre

BE



E

ORR(1);ORR(2); *flr*³/*mwh*

*flr*³/*mwh*

Fenotipo Serrata



ORR(1);ORR(2);*mwh* / TM3Bσ⁶

mwh / TM3Bσ⁶

En el caso de la mosca del vinagre *Drosophila melanogaster*, el CYP450 está involucrado en la síntesis de varias feromonas y hormonas que son requeridas para su desarrollo normal y reproducción. El CYP450 así mismo es requerido para sobrevivir en un ambiente adverso, contribuyendo con la inactivación de compuestos tóxicos. Un efecto contrario del metabolismo de los xenobióticos es manifestado por la activación de promutágenos a compuestos genotóxicos (Saner, et al., 1996).

Es importante mencionar que al utilizar estos marcadores localizados en el mismo cromosoma (3), es posible discernir fenómenos de recombinación en la región delimitada por el marcador *flr*³ y el centrómero o en la región entre los dos marcadores. Como resultado de eventos de recombinación pueden recobrase manchas sencillas y gemelas, este último evento es resultado de recombinación en el intervalo próximo al centrómero que es acotado por el marcador *flr*³. Por otra parte pueden obtenerse manchas sencillas *flr*³ o *mwh* por pérdida parcial, delección, mutación o por una no disyunción (Fig. 9) (Graf, et al., 1984)

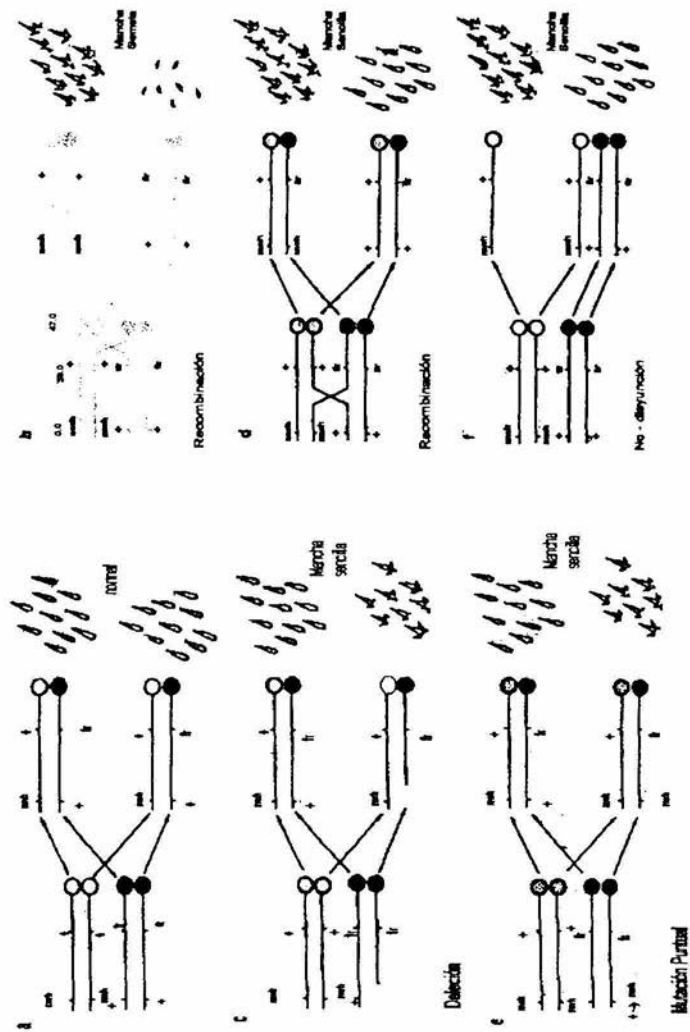


Fig. 9. A), B), C) Modelos de los eventos que conducen a la pérdida de heterocigotidad en *D. melanogaster*.

ANTECEDENTES.

Sólo 52 de los miles de compuestos naturales de las plantas han sido investigados en su capacidad cancerígena. De esos, 29 han resultado positivos en ensayos con roedores. Ames *et al.*, (1999, citado en Saffron, 2000) calcularon la relación entre la exposición humana diaria a lo largo de toda la vida (H.E.) contra la capacidad cancerígena potencial en roedores (R.P.); a mayores valores de esta relación (H.E./R.P.) hay mayor riesgo de cáncer y el ácido cafeico ha sido valorado mostrando un % HERP de 0.3 para una concentración tan alta como 66.3 mg. diarios (H.E) (Saffron, L, 2000).

El ácido cafeico está presente en muchas frutas, vegetales, condimentos y bebidas consumidas por los humanos, principalmente en formas conjugadas tales como el ácido clorogénico. Su capacidad cancerígena se probó por administración oral, en ratas y ratones (4 mM) (Hirose *et al.*, 1998). En ratones, produjo adenoma celular renal en hembras y una alta incidencia de hiperplasia celular tubular renal en animales de cada sexo. Aumentó la incidencia combinada de papiloma celular escamoso y de carcinoma del estómago anterior observada en machos de ratón, y una alta incidencia de hiperplasia del estómago anterior en ambos sexos. En ratas produjo papiloma celular escamoso y carcinoma del estómago anterior en animales de cada sexo y pocos adenomas celulares renales en machos (IARC,1997).

La administración del ácido cafeico en combinación con cancerígenos conocidos ha resultado que eleva o inhibe los efectos dependiendo del tiempo de la administración, así como de la concentración (IARC.,1997)

Los humanos y animales experimentales metabolizan el ácido cafeico produciendo los mismos metabolitos e hidrolizan el ácido clorogénico a ácido cafeico. El AC no induce micronúcleos en ratones tratados *in vivo*. Produce mutación en genes y aberraciones cromosómicas en cultivos de células de roedor. No induce mutación en genes de bacterias. Para el AC, no hay datos disponibles en el humano que indiquen que sea un cancerígeno; sin embargo, en animales se ha demostrado que es un cancerígeno y con la información disponible se puede presumir que para el humano lo es también. (IARC,1997) (ver anexo 1).

Hirose *et al.*, (1998), probaron varios antioxidantes que se consumen en niveles bajos: ácido cafeico (4 mM), sesamol, 4-metoxifenol y catecol. Se conocen como órganos blanco a la parte anterior del estómago o glándulas estomacales. Estas sustancias fueron examinadas en combinación o solas. El estudio duró dos años, utilizando ratas macho a las que se les dieron los agentes antes mencionados. Otro grupo fue tratado con compuestos cancerígenos como la metilnitrosurea, dietilnitrosamina, 1,2-dimetilhidrazina, etc. Al término del experimento se sacrificaron las ratas y se hizo un estudio histológico. Se encontró un incremento en la incidencia del papiloma del estómago anterior de 14.8 % con el ácido caféico solo ($P < 0.001$).

Duarte *et al.*, (1999), utilizaron la prueba de Ames para evaluar algunas de las moléculas fenólicas del café instantáneo, entre ellas el ácido cafeico (100 μM). Al poner la fracción S9 en valores de pH cerca de neutro, hubo un incremento en la actividad genotóxica. Estos resultados sugieren que aparte de otras moléculas presentes en el café instantáneo, responsables de su genotoxicidad en pruebas a corto plazo, las moléculas fenólicas podrían estar implicadas en la genotoxicidad del café, vía oxígeno reactivo por su auto oxidación.

Karekar *et al.*, (2000), utilizaron la prueba de Ames, (cepas TA98 y TA100 de *Salmonella typhimurium*) para examinar el efecto antimutagénico del ácido cafeico, emplearon siete concentraciones y como testigo positivo Aflatoxina B1 (AFB1), que induce mutagenicidad del 27% al 88%. El ácido cafeico en las concentraciones de 20 y 40 μmol , resultó ser un efectivo antimutagénico contra la AFB1, ya que inhibió en un 88% su capacidad mutagénica.

Karekar *et al.*, (2000) usaron la prueba en el ala en *Drosophila melanogaster* con el ácido cafeico (AC). Estos autores emplearon la cruce Estándar recíproca: *mwh/mwh x fl²/TM3, Bd⁺*, con tres dosis: 25, 50 y 100 μmoles que revelaron una ausencia de mutagenicidad y de toxicidad lo cual era de esperarse dadas las concentraciones tan bajas, en micromoles. Sobre esta base se escogieron siete dosis no mutagénicas de AC, en combinación con la Aflatoxina B1 (AFB1). Las cuatro dosis menores de AC no inhibieron la actividad mutagénica inducida por la AFB1. Un máximo de 48% de reducción en el total de manchas fue encontrada cuando se empleó una concentración de 80 μmoles de AC por vial. Todas las categorías de manchas tiene una significativa reducción en la inducción de manchas por la AFB1, con el incremento en las concentraciones de AC. La dosis- respuesta evidencia en el análisis una alta correlación, por esta razón se confirmó la antimutagenicidad del AC a estas dosis contra la AFB1 en la prueba de manchas en el ala.

Křížková *et al.*, (2000), realizaron una serie de pruebas con derivados del ácido fenólico, entre ellos el AC (25, 50, 100 y 250 μM) y como testigos positivos usaron la ofloxacina (43 μmolar) así como la naranja acridina (NA) (13.5 μM). Las pruebas se realizaron con *Euglena gracilis*. Los resultados obtenidos exhiben una significativa relación entre la concentración y el efecto inhibitorio en contra de las mutaciones inducidas por ofloxacina, las cuales son eficazmente eliminadas por las concentraciones de los ácidos fenólicos. Las mutaciones producidas por la NA fueron reducidas por la presencia del ácido cafeico. Basados en mediciones con espectrofotometría de UV, proponen que la antimutagénesis de los ácidos fenólicos, son resultado de barrer las especies de oxígeno reactivo producidas por la ofloxacina.

Pineda, *et al.*, (1999), evaluaron la capacidad antioxidante de alimentos seleccionados (tomate, cebolla, lechuga y col), su efecto protector sobre la peroxidación de ácido linoleico, y el potencial de interacción entre diferentes antioxidantes como flavonoides (rutina y quercetina), ácidos fenólicos (ácido cafeico) y vitaminas (vitamina E y C). Se examinó la eficiencia antioxidante por 2 sistemas: la capacidad antioxidante total y el efecto protector sobre la peroxidación del ácido linoleico. La mayor capacidad antioxidante total la presentó la col, seguida por la lechuga, cebolla y tomate y el mayor efecto protector sobre la peroxidación del ácido linoleico también lo presentó la col, seguida por el tomate, la lechuga y la cebolla. En conclusión, los extractos de vegetales frescos muestran un efecto antioxidante diferente y su actividad depende de la naturaleza y concentración de los antioxidantes

naturales presentes en el alimento. De tal manera que el AC, demostró que es un buen antioxidante, al alcanzar el primer lugar.

Graf et al., (1998) utilizaron la prueba S.M.A.R.T. del ala con las cruces E y B.E., en café instantáneo, para demostrar el efecto antimutagénico de éste. Como testigos positivos emplearon a mitomicina C y uretano. El café instantáneo se administró en una concentración de 5mM. Se encontró que el efecto de protección del café es independiente de la capacidad metabólica de las larvas. Se concluyó que el café es primeramente antirecombinogénico antes que antimutagénico.

Rao, et al., (1993) prueban en células *in vitro* de ratón varios antioxidantes, entre ellos el AC (100µM) y demuestran que detiene el proceso de estrés oxidativo en las células, al inhibir la actividad lipoxigenasa que metaboliza el ácido araquidónico y produce al ácido hidroxieicosatetraenoico, que es responsable de modular procesos de inflamación. Se ha demostrado además que este ácido eicosanoide promueve la adhesión de células tumorales a la matriz endotelial y subendotelial, por lo que la acción del AC sería de inhibición del proceso metastásico.

Estudios cromatográficos determinaron que el propóleo contiene un principio activo derivado del ácido cafeico conocido como CAPE (Caffeic Acid Phenethyl Ester) el cual evidenció fuerte actividad antioxidante y antiinflamatoria (Broadhurst, 1996). El CAPE demostró inhibir el crecimiento, *in vitro*, de células cancerosas. Se utilizaron fibroblastos embrionarios de rata, algunas de estas células fueron transformadas utilizando un adenovirus (tipo 5) en células W13A. Ambos tipos celulares (normales y W13A) al exponerse a CAPE (1µg/ml) encontraron que éstas últimas entraron en apoptosis. (Chiao, 1995)

El Consejo Latinoamericano de Información Alimentaria (2001) realizó una lista con algunos alimentos que poseen antioxidantes, en ellos destaca el ácido cafeico, el cual tiene capacidad para reducir el riesgo de enfermedades degenerativas, del corazón y de los ojos.

Al examinar los diferentes trabajos que se han llevado a cabo con el AC, en diferentes sistemas de pruebas, no existen pruebas suficientes para afirmar o rechazar si el AC es un cancerígeno (Tabla 3).

Tabla 3.- Resumen de las investigaciones hechas con AC

Año	Investigador	Tipo de ensayo	Resultado
1993	Rao, et al	Células de ratón (concentración 100µM)	Negativo, hay inhibición de procesos de estrés oxidativo en las células.
1995	Chiao, et al	Fibroblasto embrionario de rata, <i>in vitro</i> , CAPE. (concentración 1µg/ml)	Negativo, las células cancerosas entraron en apoptosis.
1997	International Agency for Research on Cancer	En rata y ratón, AC (concentración de 4 mM)	Positivo, los animales experimentales desarrollaron cáncer en estómago y papiloma celular escamoso
1998	Hirose, et al	Ratas macho, AC (concentración 4 mM) y en combinación con cancerígenos	Positivo, el AC incrementó la incidencia de papiloma de estómago.
1998	Graf, et al	Mosca del vinagre (SMART), café instantáneo (concentración 5 mM)	Negativo, los resultados indican un efecto de protección. Entre las moléculas del café se encuentra el AC.
1999	Duarte, et al	Prueba de Ames, con fracción S9, (AC 100 µM)	Positivo, a valores cercanos pH 7, hubo un incremento en la actividad mutagénica
1999	Pineda, et al	Extractos de diferentes alimentos (col, lechuga, etc) que contienen AC	Negativo, los resultados demuestran un efecto de protección (antioxidante)
2000	Karekar, et al	Prueba de Ames, utiliza siete concentraciones de AC	Negativo, al utilizar el AC 20 y 40 µM obtuvo protección contra la aflatoxina AFB1
2000	Karekar, et al	Ensayo SMART del ala (concentraciones de 25, 50 y 100 µM)	Negativo, obtienen resultados por debajo del testigo negativo sin significancia
2000	Kriskova, et al	<i>Euglena gracilis</i> (concentraciones 25, 50, 100 y 250 µM)	Negativo, los resultados demuestran que hay un efecto de protección, debido a los radicales -OH del compuesto.

JUSTIFICACIÓN.

La presente investigación forma parte de un proyecto conjunto en la Facultad de Estudios Superiores Iztacala entre el Laboratorio de Fitoquímica de la Unidad de Biotecnología y Prototipos, del cual se extrajo el principio activo conocido como verbascósido de *Buddleja escordoides*, y el Laboratorio de Genética Toxicológica donde se valora la genotoxicidad en las dos cruces, Bioactivación Elevada y Estándar de la Prueba S.M.A.R.T. del ala.

Considerando que el verbascósido podría utilizarse como bloqueador solar y que el metabolismo de este fenilpropanoide produce 1 molécula de AC por cada molécula metabolizada (Ávila com. per) se consideró la necesidad de valorar el efecto genotóxico del AC.

En este trabajo se valoró el efecto genotóxico del ácido cafeico en la cruce de Bioactivación Elevada (B.E.) ORR(1); ORR(2); fr^2 / TM3, $Bd^6 \times mwh/ mwh$ de la prueba S.M.A.R.T. del ala. A diferencia de Karekar et al., (2000) quienes usaron la cruce E reciproca a dosis tan bajas como 25, 50 y 100 μM , se usó la cruce B.E. y dosis de 27, 81 y 135 mM, dado que ésta cuenta con un sistema de CYP450 constitutivo alto. Por lo anterior el metabolismo xenobiótico de este ácido en esta cruce será mucho mayor que en la cruce E y a estas dosis.

OBJETIVO.

Valorar la actividad genotóxica del ácido cafeico en la cruce de Bioactivación Elevada (B.E.) de *Drosophila melanogaster* en la prueba S.M.A.R.T. del ala.

HIPÓTESIS.

H_0 = Si el ácido cafeico no tiene efecto genotóxico entonces no habrá diferencias en la frecuencia de manchas entre el testigo negativo y los tratamientos experimentales.

H_a = Si el ácido cafeico tiene efecto genotóxico entonces habrá al menos una diferencia en la frecuencia de manchas entre el testigo negativo y los tratamientos experimentales.

MATERIALES Y METODOS.

A) Ensayo de manchas en el ala

Las líneas que se utilizaron fueron *ORR(1)*; *ORR(2)*, *flr3/TM3*, *Bd^f* y *mwh/mwh*, del Laboratorio de Genética Toxicológica de la U.N.A.M., F.E.S. Iztacala, originalmente donadas por el Dr. U. Graf del Institute of Toxicology, Swiss Federal Institute of Technology and University of Zürich, Schwerzernbach, Suiza.

Las moscas se cultivaron en puré de papa en hojuela, hidratado con 20 ml. de solución A (5 ml de tegosep: 12 gr. en 100 ml de alcohol; 5 ml. de ácido propiónico y ácido ortofosfórico 10.1, aforado a un litro de agua, según Dueñas *et al.*, 2002) una vez que emergieron las moscas adultas se procedió a sexar y separar las hembras *ORR(1)*; *ORR(2)*, *flr3/TM3*, *Bd^f* vírgenes y los machos *mwh/mwh*. Esto en las siguientes ocho horas posteriores a la emergencia para asegurar que son vírgenes. Con el objetivo de garantizar que las hembras son vírgenes se separaron en tubos de ensayo que contenían 0.5 g de puré de papa en hojuela hidratados con 2 ml de solución A para su manutención durante un periodo de 72 hrs. Si en ese lapso de tiempo no hay larvas se procede a la realización de la cruce.

Se colocaron 80 hembras vírgenes y 60 machos en frascos de 250 ml con puré fresco; la cruce de hembras *ORR(1)* *ORR(2)*, *flr3/TM3*, *Bd^f* y machos *mwh/mwh* duró más o menos 72 hrs., lo que permitió que las hembras fueran fecundadas. Transcurrido este tiempo los adultos se transvasaron a un medio que contenía levadura fresca activada con agua y sacarosa donde se permitió ovopositar a las hembras. La colecta de huevos inició a las 8:00 a. m. y terminó a las 4:00 p.m. después de lo cual los adultos fueron retirados. Los frascos con levadura que contenían los huevos fueron devueltos a la incubadora a 25 ° C por 72 horas.

Después de 72 hrs. se recuperan las larvas disolviendo la levadura con agua corriente a temperatura ambiente en una coladera de acero de malla fina.

En tubos de ensayo se añadieron 0.5 g. de Medio Instantáneo Carolina para *Drosophila melanogaster* (Carolina Biological Supply Co., Burlington NC), 2ml. de la solución problema: ácido caféico, en tres concentraciones: 27 mM, 81 mM y 135 mM. diluido en agua; como testigo negativo se utilizó agua y como testigo positivo uretano 20 mM. Los diferentes tratamientos experimentales se mantuvieron a 25° C. Se realizaron tres experimentos independientes con tres repeticiones por experimento.

La recuperación de adultos se llevó a cabo a los 10 días de la colecta de huevos, fijándolos en alcohol al 70%. Posteriormente se disectan las alas desde la base con pinzas de relojero y se montan en portaobjetos con solución de Faure (50 g. de goma arábica, 20 ml. de glicerol, 50 g. de hidrato de cloral y 50 ml. de agua) se dejaron secar por 24-48 hrs cubiertos para evitar la presencia de polvo en las preparaciones y a 40° C. Después se colocó el cubreobjetos con una gotita de la solución de Faure

y se dejó secar por otras 24-48 hrs. Se colocaron pesas de 250 g. para extender las alas y evitar que hubiera burbujas. Los portaobjetos se marcaron con los datos correspondientes para su identificación.

Una vez secas las preparaciones se sellaron con barniz de uñas transparente y se observaron al microscopio óptico a 40x buscando manchas sencillas (fr^3 o mwh) o gemelas (mwh/fr^3) aprovechando la división natural que presenta el ala (Fig. 10). Los datos fueron analizados por el programa estadístico para SMART PC-versión 2.1, desarrollado por Frei y Würgler en 1988, el cual se basa en la prueba no-paramétrica ji-cuadrada para proporciones, con un grado de libertad de 0.05. En el análisis estadístico las manchas pequeñas (de 1 a 2 células), se consideran de manera independiente a las manchas grandes (3 o más células), así como las gemelas cuando están separados por dos o más líneas de tricomas. (Frei y Würgler, 1988).

De acuerdo con Frei y Würgler, (1995) para determinar el resultado, se emplearon para la prueba las siguientes hipótesis estadísticas: nula (H_0), ésta asume que el tratamiento experimental no incrementa la frecuencia de la expresión de los marcadores ocurridos de manera espontánea en el testigo; la hipótesis alterna (H_a), asume que *a priori* un tratamiento determinado incrementa la frecuencia espontánea por un cierto múltiplo (p) de la frecuencia obtenida en el testigo. Esta constante ρ indica cuantas veces debe incrementarse el número de eventos, con respecto al testigo para considerar una respuesta positiva.

Para asignar resultados estadístico positivos se utiliza de manera empírica un factor de multiplicación (se denomina m en lugar de p), se emplea $m=2$ para las manchas totales y pequeñas, utilizando para las manchas grandes y gemelas una $m=5$, según lo indicado por Frei y Würgler, (1988).

El diagnóstico estadístico por este programa puede ser cualesquiera de las siguientes:

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

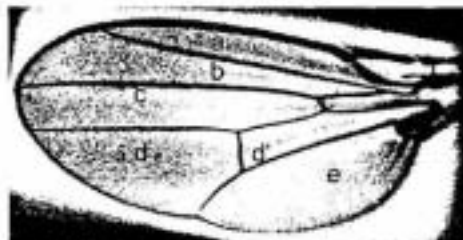


Fig. 10. Secciones del ala en *Drosophila melanogaster*.

B).- Químicos

Acido Caféico: Sigma (CAS 206-361-2) (St. Louis, MO, USA). Caroline Instant Medium para *Drosophila melanogaster* (Carolina Biological Supply, Burlington, NC, USA). Uretano (Fluka No. 94300, Reg. No. 51-79-5), agua desionizada.

RESULTADOS.

Los resultados obtenidos en los tres experimentos con la cruce Bioactivación Elevada de la prueba S.M.A.R.T. del ala en *Drosophila melanogaster*, se resumen en la Tabla 3, el ácido cafeico muestra para las tres concentraciones una respuesta negativa, con respecto a la frecuencia de manchas para el testigo negativo (agua desionizada).

PRUEBA DE MUTACION Y RECOMBINACION SOMATICAS

Tabla 4. Resumen de resultados obtenidos en la prueba del ala en *Drosophila melanogaster*. Cruza B.E.

COMPUESTO CONC. mM	NÚMERO DE INDIVIDUOS	FRECUENCIA DE (NÚMERO DE MANCHAS) MANCHAS POR ALA			STAT. DIAGN.
		Manchas simples pequeñas 1-2 células m= 2.00	Manchas simples grandes >2 células m=5.00	Manchas gemelas m=5.00	
TESTIGO NEGATIVO		48h AGUA 1H1			
	57	0.72 (41)	0.09 (5)	0.09 (5)	0.89 (51)
TRATAMIENTO 48h A. CAFEICO (27mM) 4CA1					
27	55	0.60 (33)-	0.05 (3)-	0.05 (3)-	0.71 (39)-
TRATAMIENTO 48h A. CAFEICO (81mM) 2CA1					
81	55	0.78 (43)-	0.11 (6)-	0.02 (1)-	0.91 (50)-
TRATAMIENTO 48h A. CAFEICO (135mM) 3CA1					
135	55	0.56 (31)-	0.04 (2)-	0.02 (1)-	0.62 (34)-
TESTIGO POSITIVO 48h URETANO (20mM) 5URE1					
20	45	11.87 (534)+	1.56 (70)+	0.53 (24)+	13.96 (628)+

• Diagnóstico estadístico acordado por Frei y Wüergler (Mut. Res., 203 (1988) 297-308: + = positivo; - = negativo.

m = factor de multiplicación.

Niveles de probabilidad: alpha = beta = 0.05

Los tipos de mancha más abundante de *mwh*, fueron pequeños (una y dos células). Para esta prueba se puede afirmar que a las concentraciones utilizadas (27, 81 y 135 mM) el AC no es mutagénico porque no hubo diferencias estadísticas significativas entre los experimentos y el testigo agua. La frecuencia de manchas con el promutágeno uretano por individuo con la cruce Estándar es de 2.8, (reportado por Dueñas (2002) en el Laboratorio de Genética Toxicológica de la F.E.S Iztacala) y la obtenida en este experimento con la cruce B.E. fue de 13.96, lo que significa que es 4.98 veces mayor la respuesta de la cruce B.E. de acuerdo a lo esperado.

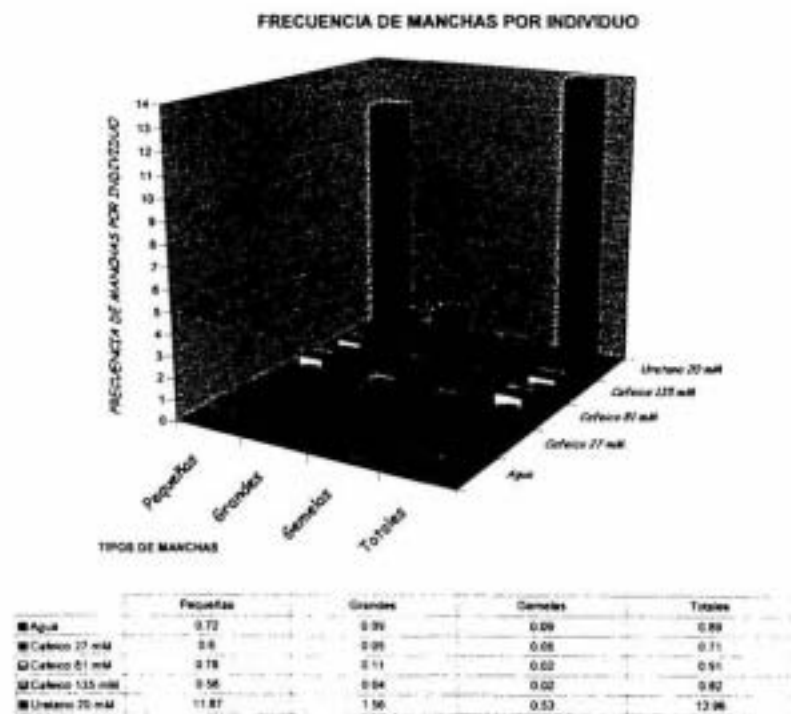


Fig. 11.- Frecuencia de manchas por individuo, se observe que las frecuencias de los tratamientos con AC son muy similares a las del testigo negativo (agua), no son estadísticamente significativas. Para esta prueba el AC, no es genotóxico.

DISCUSIÓN.

La bibliografía especializada indica que el AC es un agente cancerígeno en mamíferos pequeños (rata y ratón) a una concentración de 4 mM (Hirose *et al.*, 1998, International Agency for Research on Cancer, 1997), así como en bacterias a una concentración de 100 μ M (Duarte *et al.*, 1999), con ello ha demostrado ser un mutágeno en estos ensayos *in vivo*.

Karekar *et al.* (2000) realizaron un estudio preliminar con el AC, a concentraciones menores (25, 50 y 100 μ M) y obtuvieron resultados por debajo de la frecuencia del testigo negativo, sin ser esto estadísticamente significativo. Los resultados obtenidos en este trabajo concuerdan con los obtenidos por Karekar *et al.* A pesar de incrementar las concentraciones de AC de μ M a mM no hubo cambio estadístico significativo, ya que el AC no incrementó la frecuencia de manchas. Esto permite comprobar que a estas concentraciones no es mutagénico para esta craza en este ensayo S.M.A.R.T del ala.

Por lo anterior, la exposición a concentraciones de AC en el rango de 27 a 135 mM, por efecto del metabolismo de alimentos o compuestos que lo contengan y/o liberen no presenta riesgos genotóxicos. En el caso de que el verbascósido penetrara a la piel y fuera hidrolizado, las moléculas liberadas de AC no implicarían riesgos genotóxicos a estas concentraciones.

CONCLUSIONES.

Las conclusiones de esta prueba utilizando como modelo de investigación a *Drosophila melanogaster*, ensayo S.M.A.R.T. son :

- El ácido cafeico, demostró no tener una actividad genotóxica, en la cruz de B.E. de la prueba S.M.A.R.T. del ala, a concentraciones de 27, 81 y 135 mM. Esto permite sugerir que la hidrólisis del verbascósido a las mismas concentraciones, no tendrá efecto genotóxico en los usuarios.
- Es necesario continuar con las pruebas en animales superiores, como cobayos, conejos, y otros ensayos para contar con más argumentos que permitan concluir de manera irrefutable que el AC no es mutagénico a estas y otras concentraciones.

ANEXO 1

Tabla 4.- Riesgo HERP(%) para el AC y otros compuestos en alimentos comunes, DDT, fenobarbital y aire en una casa. (Tomado de Ames y Swirsky, 1999)

Riesgo HERP (%)	Exposición humana diaria media (en Estados Unidos)	Dosis correspondiente de Compuestos cancerígenos para roedores	Dosis tóxica para los roedores (TD 50, en mg/kg/j)
0.001	Ciruela, 2.00 g	Ácido caféico, 276 µg	297
0.001	Pera, 3.29 g	Ácido caféico, 240 µg	297
0.002	Zanahoria, 12.1 g	Ácido caféico 374 µg	297
0.004	Papa 54.9 g	Ácido caféico 867 µg	297
0.004	Apio 7.95 g	Ácido caféico 858 µg	297
0.02	Manzana 32.0 g	Ácido caféico 3.40 mg	297
0.04	Lechuga 14.9 g	Ácido caféico 7.90 mg	297
0.1	Café 13.3 g	Ácido caféico 23.9 mg	297
0.02	Café 13.3 g	Furfural 2.09 mg	197
0.004	Pan blanco 67.6 g	Furfural 500 µg	197
0.5	Vino 28.0 g	Alcohol etílico 3.36 ml	9110
0.003	Nuez moscada 27.4 mg	d-Limoneno 466 µg	204
0.03	Pimienta negra 446 mg	d-Limoneno 3.57 mg	204
0.002	DDT (antes prohibición de 1972)	DDT 13.8 µg	12.8
14	Fenobarbital, 1 somnífero	Fenobarbital 60 mg	6.09
0.4	Aire en una casa (14hrs/día	Formaldehído, 598 µg	2.19

Los riesgos eventuales de exposición a toda una variedad de sustancias químicas reconocidas como cancerígenas para los roedores están, clasificados según el índice HERP, que expresa el nivel de exposición cotidiano a una sustancia determinada en un porcentaje de la dosis tóxica para los roedores -DT50, dosis a la cual el 50% de los roedores sometidos a test (ratones o ratas) han desarrollado tumores a lo largo de su vida-. El índice está calculado a partir de la exposición media cotidiana de un norteamericano al producto en cuestión (segunda columna)- la media se ha establecido sobre la duración total de vida-. A esta exposición corresponde una dosis cotidiana de compuestos cancerígenos (tercera columna), dosis que se divide por los 70 kg del peso de un adulto, a fin de obtener un valor por kilogramo y día comparable a la DT50 (cuarta columna, en mg/kg/j) lo cual da el índice HERP.



U.N.A.M. CAMPUS

Laboratorio de Genética Toxicológica F.E.S. IZTACALA

Referencias.

Ames, B.N y Swirsky, L. Contaminación, cáncer y alimentación. *Mundo Científico* 1999, 207: 30-37

Athar, M., Agarwal, R., Bickers, D., y Mukhtar, H. Role of reactive oxygen species in skin. in: *pharmacology of the skin*. Crc press series in pharmacology and toxicology, 1992. p.270-276.

Ávila, G. Estudio fitoquímico de *Buddleja perfoliata* y *Buddleja escordioides*, evaluación de la actividad antibacteriana y fotoprotectora de sus principales metabolitos secundarios. Tesis de doctorado, UNAM Campus Iztacala, Tlalnepantla, Edo. Mex., 1999.

Beindic, A. Role of antioxidants in the maintenance of immune function. in: *natural antioxidants in human health and disease*. USA. Academic press Inc. 1994.

Broadhurst, C. Benefits of bee propolis. *Health Suppl. Retailer* 1996, July: 46-48.

Consejo Latinoamericano de Información Alimentaria [en línea] 2001. [fecha de acceso 20-septiembre-2001] disponible en:

<http://www.cia.org.mx/diadocs/2708ali.html>

IZT.

Colegio Suizo de Mexico, [en línea] 1998. [fecha de acceso 20-septiembre-2001] disponible en: www.csm.edu.mx/Trabajos/Biochemie.htm

Chaves, G., Montiel, G. M., Sgroppo, S. C., Avanza, J. R. [en línea] Capacidad antioxidante de pimientos morrones 2000. *Comunicaciones científicas y tecnológicas*. [fecha de acceso 30-junio-2001] disponible en:

http://www.unne.edu.ar/cyt/2000/8_exactas/e_pdf/e_049.pdf

Chiao C., Carothers, A., Grumberger, D., Solomon, G., Preston, G., Barret, C. Apoptosis and altered redox state induced by caffeic acid phenethyl ester - CAPE - in transformed rat fibroblast cells. *Cancer Res.* 1995, 55: 3576-3583.

Delgado-Rodriguez, R. A., Ortiz-Martelo R., Graf, U., Villalobos-Pietrizzzi R., Gomez-Arroyo, S. Genotoxic activity of environmental important polycyclic aromatic hydrocarbons and their nitro derivatives in the Wing spot test in *Drosophila melanogaster*. *Mutat. Res.* 1995, 341:235-247.

Demerec, M. *Biology of Drosophila*. USA. Hafner Pub. Co. 1965.

Duarte, M. P., Laires, A., Gaspar, J., Leao, D., Oliveira, J. S., Rueff, J. Genotoxicity of instant coffee: possible involvement of phenolic compounds. *Mutat. Res.* 1999; 442: 43-51.

Dueñas, I.E. Efecto mutagénico y recombinogénico de la *p*-fenilenediamina y la *o*-fenilenediamina, mediante la prueba de mutación somática en alas de *Drosophila melanogaster* cruces E y A.B. Tesis de maestría, F.E.S. Iztacala, Edo. Mex.; 2002.

Dueñas, I. E., Heres, M. E., Castañeda, L. Easy raising of *Drosophila melanogaster* on a medium consisting of mashed potato flakes and a preservative solution. *Drosoph. Inf. Serv.* 2002; 84 january

Fernández, G. La pérdida de ozono en la estratosfera y su repercusión en piel. *Dermatología Rev. Mex.*; 1994; 38 (2): 121-124.

Freeman, S., Hacham, H., Gange, R., Maytum, D., Sutherland, J., Sutherland, B. Wavelength dependence of pyrimidine dimer formation in DNA of human skin irradiated *in situ* with ultraviolet light. *Proc. Natl. Acad. Sci.*; 1989; 88: 5605 - 5609.

Frei, H. y Würigler, F. E. Statistical methods to decide whether mutagenicity test data from *Drosophila* assays indicate a positive, negative or inconclusive result. *Mutat. Res.*; 1998; 203: 225-308

Frei, H. y Würigler, F. E. Optimal experimental design and sample size for the statistical evaluation of data from somatic mutation and recombination test (SMART) in *Drosophila*. *Mutat. Res.*; 1995; 334: 247-325.

García, B. Evaluación de un filtro solar de *Yucca filifera*. Tesis de Licenciatura, F.E.S. Iztacala, Edo. Mex. 1998

García-Bellido, A. y Merriam, J. Parameters of the wing imagal disc development of *Drosophila melanogaster*. *Dev. Biol.*; 1971; 24: 61 - 87.

García-Bellido, A. y Dapena, J. Induction, detection and characterization of cell differentiation mutants in *Drosophila melanogaster*. *Mol. Gen.*; 1974; 128: 117 - 130.

Gerschman, R., Gilbert, D., Nye, S., Ferr, W. Oxygen poisoning and x radiation a mechanism in common. *Science*; 1954; 119: 623-626.

Graf, U., Würigler, F. E., Katz, A. J., Frei, H., Juon, H., Hall, C. B., Kale, P.F. Somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Environmental mutagenesis* 1984; 6:153-188

Graf, U. y van Shaik, N. Improved high bioactivation cross for the Wing Somatic Mutation and Recombination Test (S.M.A.R.T.) in *Drosophila melanogaster*. *Mutat. Res.* 1992; 271:59-67.

Graf, U., Spanó, M., Guzman-Rincón, J., Abraham, S., Andrade, H. The Wing Somatic Mutation and Recombination Test (S.M.A.R.T.) in *Drosophila melanogaster*: An efficient tool for detection of genotoxic activity of pure compounds and complex mixture as well as for studies on genotoxicity. Second conference of Pan-African Environmental Mutagen Society (PAEMS) 1996; 23-25 Jan. *African Newsletter On Occupational Health and Safety*.

Graf, U., Abraham, S. K., Guzman-Rincon, J., Würigler, F. E. Antigenotoxicity studies in *Drosophila melanogaster*. *Mutat. Res.* 1998; 402: 203-209.

Guzman-Rincon, J. y Graf, U. *Drosophila melanogaster* somatic mutation and recombination test. En: *Biomonitors and biomarkers as indicators of environmental change: a handbook*. Ed. F. M. Butterworth L.D. Corleun and Guzman-Rincon, Plenum Publishinf Corp. 1995. p. 169-181.

Hirose M., Takesada Y., Tanaka H., Tamano S., Kato T., Shirai T. 12 Carcinogenicity of antioxidants BHA, caffeic acid, sesamol, 4-methoxyphenol and catechol at low doses, either alone or in combination, and modulation of their effects in a rat medium-term multi-organ carcinogenesis model. First Department of Pathology, Nagoya City University, Medical School, Japan. *Carcinogenesis* 1998; 19(1):207

Instituto Mexicano del Seguro Social. Atlas de plantas medicinales en México, IMSS. 1994

International Agency for Research on Cancer. [en línea] 1997 [fecha de acceso 30-junio-2001] disponible en:
<http://iacr.fr.193.51.164.11/htdocs/Monographs/Vol56/03-caff.html>

Jürgen, A. Antioxidants in the skin. In: *Pharmacology of the skin*. CRC Press Series in Pharmacology and Toxicology. 1992. p. 250-260.

Karekar, V., Joshi, S., Shinde, S.L. Antimutagenic profile of three antioxidants in the Ames assay and the *Drosophila* wing spot test. *Mutat. Res.* 2000; 468(2):183-94

Kaur, S., Grover, I. S., Singh, M., Kaur, S. Antimutagenicity of hidrolizable tannins from *Terminalia chebula* in *Salmonella typhimurium*. *Mutat. Res.* 1998; 419: 169-179.

Krnzkova, L., Nagy, M., Polonyi, J., Dobias, J., Belicova, A., Grncal, D., Krjovic, J. Phenolic acids inhibit chloroplast mutagenesis in *Euglena gracilis*. *Mutat. Res.* 2000; 469:107-114.

Larson, R., The antioxidants of higher plants. *Phytochemistry.* 1988; 27(4): 969 - 978.

Larson, R. Naturally occurring antioxidants. CRC Press LLC. 1997

Leeson, T., Leeson R., Paparo, A. *Texto/Atlas de histología*. México. McGraw- Hill. 1989.p. 363-393.

Lehninger, A. *Principios de Bioquímica*. Barcelona, España Omega. 1981.

Martin-Dominguez, C. Página personal [fecha de acceso 25-febrero-2001] Disponible en: <http://personal.redestb.es/martin/pfito.html>

Madhukar, A. Sunscreens: Principles of photoprotection. In: *Pharmacology of the skin*. CRC Press Series in Pharmacology and Toxicology 1992, 230-247.

Oxiresearch 1999 [fecha de acceso: 19-febrero-2001]
Disponible en: www.oxiresearch.com/products/antioxidants/26543/default.html

Pineda, D., Salucci, M., Lázaro, R., Maiani, G., Ferro-Luzzi. Capacidad antioxidante y potencial de sinergismo entre los principales constituyentes antioxidantes de algunos alimentos. *Rev. Cubana Alimen. Nutr.* 1999 13(2): 104-111.

Podolsky, J. Situación actual de la fitoterapia. Propiedades biológicas de principios activos de origen vegetal contenidos en el propóleo. www.inta.gov.ar/apinet/congresolc04.pdf

Ramos, P., Abundis, H. M., Gaytan, J. C., Ordaz, M. G., Orozco, P. A., Maldonado, J., Hernández, J., González, E., Reyes, P., Galicia, E. M., Muñoz, J. A. *Manual de laboratorio de Drosophila melanogaster*. México. Ed McGraw-Hill. 1993

Rangel, E. Evaluación del efecto genotóxico de ortofenilenediamina en *Drosophila melanogaster* utilizando la prueba S.M.A.R.T. en cruza E. y B.E. Tesis de Licenciatura. UNAM, FES IZTACALA, Tlalnepanitla, Edo. Mex. 2001.

Rao, C., Desai, D., Simi, B., Kulkarni, N., Amin, S., Reddy, B. Inhibitory effect of Caffeic esters on azoxymethane-induced biochemical change and aberrant crypt foci formation in rat colon. *Cancer Res.* 1993, 53: 4182-4188.

Rusell, O., Structure of the skin. In: *Pharmacology of the skin*. CRC Press Series in Pharmacology and Toxicology. 1992. p. 14-25

Rzedowski, J. *Vegetación de México*. México. Ed. Limusa. 1985

Saeki, K, Murakami, R., Kohara, A., Shimizu, N., Kawai, H., Kawazoe, Y., Hakura, A. Substituent effect of a fluorine atom on the mutagenicity of nitroquinolines. *Mutat. Res.* 1999, 441: 205-213.

Saffron, L. *Organic Food and Cancer Risk* 2000; [fecha de acceso: 19-febrero-2001] disponible en: www.positivehealth.com/Articles/Organic%20and%20Vegetarian/safron30.html.

Sanchez, J. A. Evaluación de la genotoxicidad del Tamoxifén utilizando la prueba S.M.A.R.T. (cruza H.B.) en *Drosophila melanogaster*. Tesis de Licenciatura. UNAM, FES IZTACALA, Tlalnepanitla, Edo. Mex. 2001.

Saner, C., Weibel, B., Würzler, F., Sengstag, C. Metabolism of promutagens catalyzed by *Drosophila melanogaster* CYP6A2 enzyme in *Saccharomyces cerevisiae*. *Environmental and Molecular mutagenesis*. 1996; 27: 46 – 58.

Universidad de Indiana, EUA. 1994 [fecha de acceso 29-septiembre-2001] Disponible en: <http://www.flybase.bio.indiana>

van Iersel, M., Verhagen, H., van Bladeren, P. The role of biotransformation in dietary (anti)carcinogenesis. *Mutat. Res.* 1999, 443: 259 – 270.

Vogel, E.W., *Genotoxic chemical. An introduction into principle of Genetic Toxicology*. Apuntes del Primer Taller Latinoamericano en Genética Toxicológica en *Drosophila melanogaster*. Tlaxcala, México. Sin Publicar. 1991

Wolf, C. Metabolic factors in cancer susceptibility. *Cancer Surveys* 1990; 9: 437 – 474.