



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
IZTACALA**

“VALORACIÓN DE LA GENOTÓXICIDAD DEL
ÁCIDO CAFEICO EN LA CRUZA
ESTÁNDAR (E) DEL ENSAYO
SMART EN ALA DE *Drosophila melanogaster*”

T E S I S

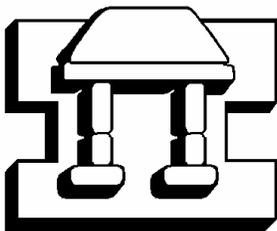
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

PRESENTA:

JUANA LAURA PERDIGÓN MOYA

DIRECTORA DE TESIS:



IZTACALA

**M. en C. MARÍA DE JESÚS LAURA
CASTAÑEDA PARTIDA**



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.

DEDICATORIAS

A mis padres Teresa y Marco Antonio por todo su apoyo, comprensión, paciencia, confianza y sobretodo su amor, por estar siempre a mi lado ayudándome y alentándome para seguir adelante esto lo hicimos juntos gracias por todo lo que me han dado los quiero mucho

AGRADECIMIENTOS

A mis hermanos: Karina, Nena y Toño por estar a mi lado y compartir momentos especiales los quiero gracias por estar conmigo.

A mis sobrinas: Natalia por enseñarme que no hay que ser grande para ser fuerte, a Michelle por tu madurez, aunque eres muy pequeña pero muy lista y a Fernanda por tus sonrisas y tu inteligencia. A las tres por ser una esperanza y llenar mi vida de alegría.

A mis tíos: Juan y Oliva por su apoyo y cariño.

A mis Abuelitos: Gregorio y Nico por su amor y por lo que me han enseñado.

A mis Abuelitos: Paco y Abigail por sus recuerdos.

A las maestras: Laura, Maru e Irma por su gran ayuda, comprensión, apoyo y paciencia y enseñarme que las cosas requieren trabajo y mucho esfuerzo.

A Clara por ser una gran amiga y compartir momentos difíciles conmigo sigues tú.

A Lucero por ser una de mis mejores amigas y por fortaleza.

A Chucho, Alan, Alejandro, Lalo, Cuauhtémoc, Agustín por brindarme su amistad.

A la señora Elvia, a Fer y al señor Vale por preocuparse por mí, por su cariño y apoyo.

A Diego por ser una persona muy especial, por tu sinceridad, honestidad y por ayudarme a lograr esto.

A Rosalba Tavares Por su apoyo.

ÍNDICE

RESUMEN.....	1
INTRODUCCIÓN.....	2
• ENSAYO SMART.....	6
• LINEAS Y MARCADORES.....	7
• CRUZAS.....	9
ANTECEDENTES.....	10
JUSTIFICACIÓN.....	14
OBJETIVO.....	14
HIPÓTESIS.....	14
MATERIALES Y MÉTODOS.....	15
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	16
CONCLUSIONES.....	22
ANEXO 1.....	23
ANEXO 2.....	26
REFERENCIAS.....	29

RESUMEN

El ácido cafeico (AC) es uno de los principales ácidos fenólicos, presente en la dieta humana principalmente en productos de origen vegetal y actualmente es un tema de controversia ya que en diferentes estudios se ha comprobado que varía su efecto reportándose como antígenotóxico, genotóxico, antimutagénico, antioxidante y mutagénico. En este trabajo se valoró el efecto genotóxico del AC utilizando el ensayo SMART (Somatic Mutation and Recombination Test; en español Ensayo de Mutación y Recombinación Somática), en el ala de *Drosophila melanogaster* utilizando la cruce Estándar (ST) con niveles regulados de CYP450. Se alimentaron larvas de 72 +/- 4 h con concentraciones de 27, 57.8, 81, 135 y 173 mM de AC. Los resultados muestran un efecto genotóxico en la concentración 173 mM obteniendo una frecuencia estadísticamente significativa en manchas pequeñas. En las concentraciones 27, 57.8, 81 y 135 mM la frecuencia de manchas pequeñas se encontró por debajo de la frecuencia del control agua por lo que se deduciría que el AC pudiera presentar efectos protectores. La relación que existe entre la tasa de mortalidad de los individuos (CL_{50}) y las concentraciones utilizadas indican que el AC tiene efectos citotóxicos o citostáticos. Se propone que por lo tanto la concentración de 173 mM sobrepasa la capacidad de detoxificación de los individuos y por tanto no se logra una eficiente eliminación del compuesto.

INTRODUCCIÓN

El ácido cafeico (AC) (Figura 1) es uno de los principales representantes de la familia de los ácidos fenólicos orgánicos, principios activos de origen vegetal de potente actividad biológica. Está involucrado en muchas acciones metabólicas y se encuentra de manera natural en muchos productos comestibles derivados de plantas, frutas, condimentos y bebidas (té, café y vino rojo) consumidos por los seres humanos (VanBesien y Marqués,

FÓRMULA: $C_9H_8O_4$
PESO MOLECULAR:
108.2 g.

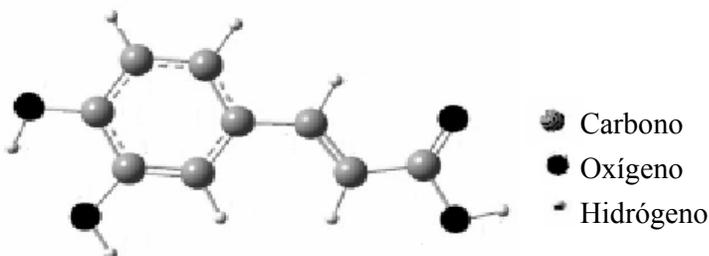


Fig. 1. Molécula del ácido cafeico
(Tomado de VanBesien y Marqués, 2003).

Este compuesto se ha reportado como agente antimutagénico en concentraciones de 0.2, 0.25, 0.4, 0.5 y 1 mM (Karekar *et al.*, 2000) y como antioxidante (Podolsky, 2001), pero también como agente cancerígeno en tratamientos a 2 mM (Hirose *et al.*, 1998) y como agente genotóxico a 1mM (Szeto *et al.*, 2002). En México como en otros países las plantas se han usado ancestralmente con fines curativos para aliviar diferentes tipos de padecimientos. Hoy día, hay un resurgimiento del uso de productos a partir de plantas (Wegener y Fintelman, 2000). El extracto metanólico del arbusto *Buddleja scordioides* (Figura 2) se utiliza de manera empírica como protector solar natural en el Estado de San Luis Potosí, México (Ávila-Acevedo 2002). Un efecto tóxico o genotóxico del AC impediría promover el verbascósido como filtro solar químico en las concentraciones recomendadas de 2 mg/cm² (Heres-Pulido *et al.*, 2005).



Fig. 2. *Buddleja scordioides*.
(Tomado de Ávila-Acevedo, 2002).

Este extracto contiene un principio activo conocido como verbascósido fenilpropanóico glicósido (Figura 3), una molécula compuesta por 2-(3,4-dihidroxifenil) etanol y un grupo cafeoil, los cuales se encuentran unidos a una β -glucosa por medio de un enlace éster en el C1 y C4 respectivamente.

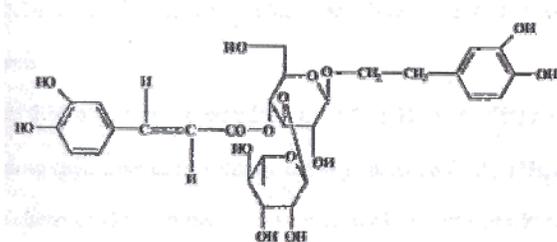


Fig. 3. Verbascósido
(Tomado de Ávila-Acevedo, 2002).

La hidrólisis química del verbascósido tanto *in vitro* como *in vivo* es realizada por enzimas esterasas y glucosidasas que transfieren grupos funcionales al agua. La hidrólisis del verbascósido genera una molécula de 2-(3, 4- dihidroxifenil) etanol y una de ácido cafeico (3, 4- ácido dihidroxicinámico) (AC) (Ávila-Acevedo, 2002). Su presencia en el verbascósido implicaría un riesgo potencial para los usuarios del extracto metonólico de *Buddleja scordioides*.

Teóricamente la óptima aplicación de un protector solar es de 2 mg/cm² (Griffin *et al.*, 1997), aunque el promedio real de aplicación es de 0.5 a 1.0 mg/cm² (Wulf *et al.*, 1997). Considerando las reaplicaciones cada 30 minutos en una persona de 70 kg se requiere de 6.25 a 12.5 g para cubrir toda la superficie de la piel. El tiempo de exposición a los rayos UV depende de varios factores, y este puede variar desde 10 min hasta 360 min dependiendo el tipo de piel, la región geográfica y la estación del año. (Duro *et al.*, 2003).

Biotransformación de Agentes Químicos

Las sustancias químicas naturales forman parte de la historia y evolución humana y el ser humano posee numerosas defensas naturales que lo protegen de los efectos de las toxinas (Ames y Gould, 1999). Un mecanismo de defensa es la biotransformación o metabolismo de los xenobióticos, proceso que lleva una conversión metabólica de los compuestos extraños presentes en los organismos (Boelsterli, 2003; Burrell, 1993). Las principales clases de xenobióticos de importancia médica son los fármacos,

cancerígenos químicos y varios compuestos que han llegado a nuestro medio ambiente. El metabolismo convierte a las moléculas liposolubles en grandes metabolitos hidrosolubles que pueden excretarse con gran facilidad (Figura 4).

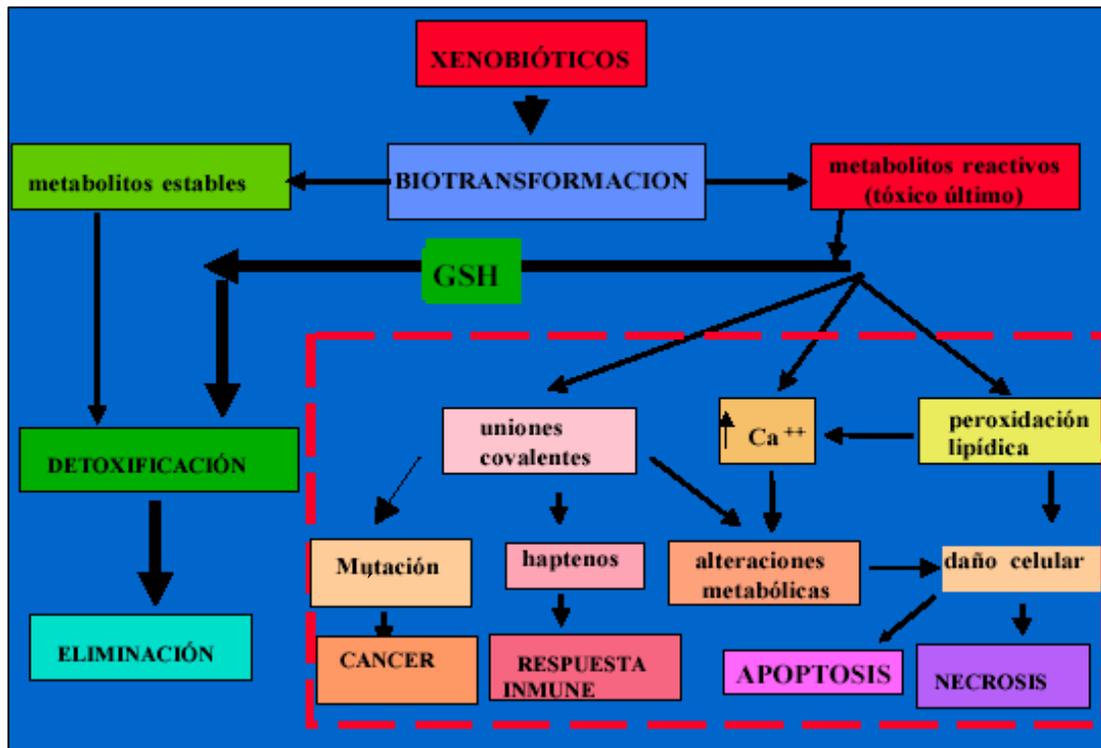


Fig. 4. Reacción General del Mecanismo de los Xenobióticos. (Tomado de <http://www.uv.es/jcastell>).

Los CYP450s (Figura 5) conforman a una superfamilia de hemoproteínas que se caracterizan por presentar una secuencia de aminoácidos muy conservada y por mostrar un pico en el espectro de absorbancia a los 450 nm. La diversidad de los CYP450s está muy bien establecida en términos tanto de las reacciones que catalizan, como de la diversidad de sustratos sobre los cuales actúan (Jiménez y Merchant, 2003). Las funciones que se llevan a cabo en el metabolismo incluyen la oxidación, peroxidación, y la reducción de esteroides, ácidos grasos, prostaglandinas, aminas biogénicas, feromonas y productos secundarios de plantas. Estas enzimas también se requieren para la supervivencia de los organismos en medios que les son particularmente adversos, ya que contribuyen a la inactivación de muchos compuestos tóxicos. Un efecto dual en el metabolismo de los compuestos xenobióticos es la activación de diversos promutágenos, como drogas y agentes ubicuos en el ambiente, hacia un compuesto genotóxico. Los CYP450s están presentes en la fase I del metabolismo de los xenobióticos, en la que oxigenan a un sustrato; la fase II del metabolismo emplea al oxígeno como el sitio a

conjugar, reacción que es mediada por la Glutatión-S-Hidrogenasa (GSH), la glucorinización o por la glicina. Ambas fases del metabolismo son necesarias para la desintoxicación (Boelsterli, 2003; Jiménez y Merchant, 2003; Santiago *et al.*, 2002; Córdoba, 2001; Franklin *et al.*, 2000; González, 1992; Murray *et al.*, 1992).

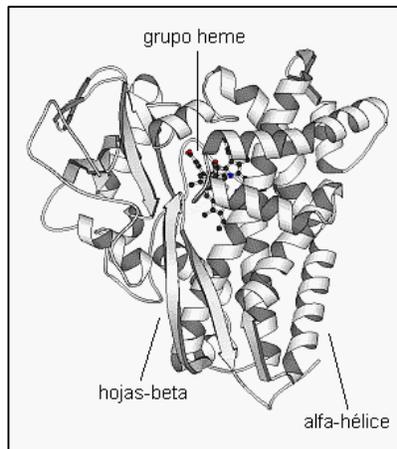


Fig. 5. Estructura del Citocromo P450.
(Tomado de www.mogensgallardo.com/p450/estructu.html).

Los CYP450s desempeñan un papel muy importante en los procesos de mutagénesis y cancerogénesis ya que de éstos depende en gran medida la biotransformación de compuestos inertes a metabolitos electrofílicos reactivos, los que pueden interactuar en forma covalente con el ADN. Los aductos así formados pueden ser reparados en forma eficiente, o bien, el proceso mismo de la reparación puede promover errores en la secuencia de los nucleótidos, generándose una mutación estable que se transmite a la siguiente generación (Jiménez y Merchant, 2003; Boelsterli, 2003; Mckinnon y Evans, 2002). En los insectos se han identificado diversas secuencias que codifican para los CYP450. Los genes CYP450 pertenecen a 25 familias, 5 de las cuales están presentes en lepidópteros, coleópteros, himenópteros, ortópteros e isópteros. Las isoformas de la familia CYP6 son específicas de los insectos, mientras que las de la familia CYP4 presentan homología con secuencias de vertebrados. Se han identificado por bioinformática 90 genes de la superfamilia de los CYP450 en el genoma de *Drosophila melanogaster*. De éstos, 83 secuencias codifican para un producto funcional y 7 aparentemente son pseudogenes. Más de la mitad de los genes pertenecen a las familias 4 y 6; existen además 8 genes que codifican para CYP450 mitocondriales (Tijel *et al.*, 2001).

Ensayo SMART

El ensayo SMART en ala (*Somatic Mutation And Recombination Test*; en español: Ensayo de Recombinación y Mutación Somáticas) ha demostrado ser efectivo en la detección de mutágenos (Karekar *et al.*, 2000). Se basa en la pérdida de heterocigosidad de marcadores recesivos en el ala de *Drosophila melanogaster*. Se emplean marcadores genéticos que afectan al genotipo de las células de los discos imagales (Graf *et al.*, 1984). Los discos imagales son bolsas epiteliales de alrededor de 20 a 50 células que permanecen indiferenciadas durante el estadio embrionario y larvario pero durante la metamorfosis dan origen a estructuras que conformarán al organismo adulto tales como: antenas, patas, ojos, alas, etc. De tal manera que, si ocurriera daño genético en una de estas células, éste se expresará en el adulto, como un clon de células mutantes en el tejido (Villem, 1998), lo que permite una detección del cambio genético producido *in vivo*. Las alteraciones genéticas pueden ser debidas a mutaciones puntuales, aneuploidías, deleción, recombinación mitótica y no disyunción provocados por un compuesto químico o agente físico (Figura 7).

En este ensayo se expone a larvas transheterocigotas con genotipo ($mwh\ flr^{3+} / mwh^+ flr^3$) y fenotipo silvestre (sin muescas en los bordes de las alas) y heterocigotas con genotipo ($mwh\ flr^{3+}/TM3, Bd^S$) y fenotipo *Beaded-Serratia* (con muescas en los bordes de las alas) que se obtienen de la cruce ST y larvas transheterocigotas con genotipo (ORR(1)/+ ; ORR(2) / + ; $mwh\ flr^{3+} / mwh^+ flr^3$) y fenotipo silvestre (sin muescas en los bordes de las alas) y heterocigotas con genotipo (ORR(1)/+; ORR(2) / +; $mwh\ flr^{3+} / TM3, Bd^S$) y fenotipo *Beaded-Serratia* (con muescas en los bordes de las alas) que se obtienen de la cruce HB a una sustancia; si ocurriera daño en el material genético, éste se puede determinar mediante métodos estadísticos, al comparar la frecuencia de manchas en los organismos expuestos con la obtenida en organismos no expuestos (Guzmán-Rincón y Graf, 1995).

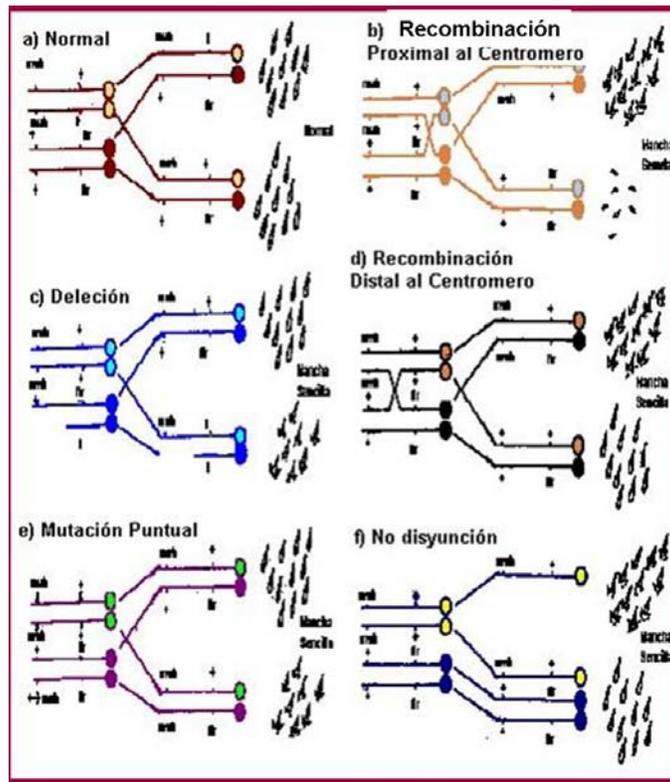


Fig. 7. Eventos que ocasionan la pérdida de heterocigosis en *Drosophila melanogaster*: a) Normal, b) Recombinación proximal, c) Delección, d) Recombinación distal, e) Mutación puntual, f) No-disyunción (Modificado de Graf *et al.*, 1984).

Líneas y Marcadores

El ensayo SMART utiliza tres líneas con los siguientes marcadores: “multiple wing hairs” (*mwh/mwh*), “Oregon- flare” (*ORR (1); ORR (2); flr³ / TM3, Bd^s*) y “flare” (*flr³/TM3, Bd^s*).

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). En el fenotipo silvestre a cada célula corresponde un tricoma (Figura 8) (Graf y van Schaik, 1992).

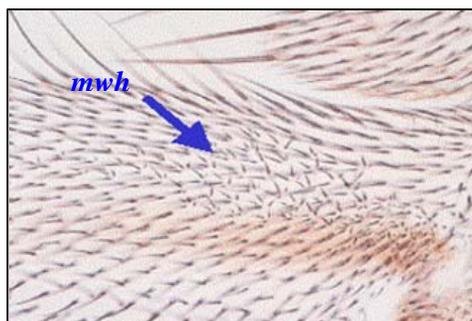


Fig. 8. Marcador genético *mwh*.

flr³ (*flare*): Tricomas mal formados cortos en forma de flama o roseta de maíz; mutación recesiva localizada en el brazo izquierdo del cromosoma 3 en posición próxima anterior 3(38.8). Esta mutación es letal en homocigosis (Ramos, 1993). Sin embargo, las células individuales homocigotas en los discos imagales de las alas son viables y pueden producir clones mutantes en las células de las alas del adulto (Figura 9) (Graf, 1996).

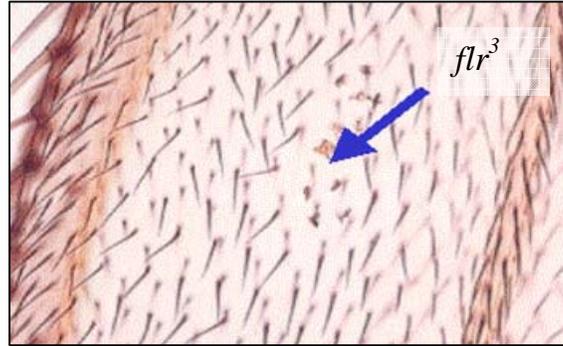


Fig. 9. Marcador genético *flr³*.

Bd^s (*Serratia*): Para reconocer fenotípicamente a las línea Oregon- *flare* se utiliza este marcador dominante que se manifiesta como muescas en los bordes de las alas; es letal en homocigosis. Se localiza en el cromosoma 3 (92.5) (Figura 10) (Ramos, 1993).



Fig. 10. Marcador genético *Bd^s*.

TM3 (inversión *TM3*): Como los marcadores *flr³* y *Bd^s* son letales en homocigosis la línea presenta un cromosoma balanceador con inversiones múltiples (*TM3*): dos paracéntricas (L y R) y una pericéntrica (L + R) que evita recombinación en meiosis y permite mantener la línea, la cual está formada por individuos heterocigotos para los marcadores letales (Graf, 1996).

Oregon-*Flare*: *ORR (1)*; *ORR (2)* (Oregon). La línea Oregon-*Flare* fue construida por Frölich y Würigler en 1989. Esta línea presenta en el cromosoma 2 de la línea *OR(R)* el gen resistente al DDT (Dapkus y Morell, 1997 citado en Graf y van Schaik, 1992 y Delgado Rodríguez *et al.*, 1995). Este cromosoma a su vez acarrea la mutación

dominante *Rst* (2) *DDT* la cual confiere no sólo la resistencia al DDT a insecticidas organofosfóricos en larvas y adultos sino también el incremento general en el metabolismo xenobiótico (Lindsley y Zimm, 1992 citado en Delgado Rodríguez *et al.*, 1995). Esta mutación es responsable de incrementar de manera constitutiva los niveles de CYP450s, complejo enzimático que como ya se ha mencionado participa activamente en la oxidación y reducción metabólica de diferentes compuestos inactivando o activando promutágenos (Graf y van Schaik, 1992; Delgado *et al.*, 1995).

Cruzas

Las cruzas empleadas para el ensayo SMART en ala son: **estándar** (**ST** por sus siglas en inglés) (hembra virgen *flr³/TM3, Bd^s* x macho *mwh/ mwh*) y **bioactivación elevada** (**HB** por sus siglas en inglés) (hembra virgen *ORR(1); ORR(2); flr³/TM3, Bd^s* x macho *mwh/ mwh*). Las cruzas permiten detectar compuestos promutágenos y mutagenos; la diferencia entre estas cruzas son CYP450s ya que la craza estándar (ST) los tiene en niveles regulados y la craza bioactivación elevada (HB) en niveles constitutivos (Graf y van Schaik, 1992).

Es importante mencionar que el utilizar marcadores localizados en el mismo cromosoma permite discernir fenómenos de recombinación entre la región delimitada por el marcador *flr³* y el centrómero o en la región entre los dos marcadores (Figura 7). 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 *flr³*, mientras que las manchas sencillas *flr³* y *mwh* se obtienen por pérdida parcial o total del cromosoma 3 por no disyunción, y por recombinación entre la región de los marcadores *mwh* y *flr³* (Figura 7) (Graf *et al.*, 1984).

ANTECEDENTES

El estudio del AC ha reportado diferentes efectos efectos lo cual ha generado controversia alrededor de este compuesto.

Carcinogénesis

Menos de 100 de los miles de compuestos naturales en las plantas han sido estudiados con pruebas de genotoxicidad. De esos, 29 han resultado positivos en ensayos con roedores (Ames y Gould 1999). Estos autores elaboraron una lista cuantitativa de cancerígenos sintéticos y naturales. Para cada compuesto, calcularon el porcentaje de exposición diaria humana durante toda la vida, a la potencia de carcinogénesis en roedores: el AC se encuentra en la lista de cancerígenos con una dosis tóxica media de 297 mg/g (Saffron, 2000; Ames y Gould, 1999). Hirose, et al (1998) probaron varios antioxidantes que se consumen en niveles muy bajos (2 mM) entre ellos el AC. Estudiaron un grupo de ratas macho al que administraron AC vía oral y otro grupo al que trataron con compuestos cancerígenos como la metilnitrosurea (MNU), dietilnitrosamina (NDEA), 1,2-dimetilhidrazina. Al término del experimento se sacrificaron las ratas y se hizo un estudio histológico que reveló un incremento en la incidencia de papiloma de estómago de 14.8% con el AC.

Antimutagénesis

Karekar et al. (2000) utilizaron la prueba de Ames (cepas TA98 y TA100 de *Salmonella typhimurium*) para examinar el efecto antimutagénico del AC empleando diferentes concentraciones y como testigo positivo el cotratamiento aflotoxina B1 (AFB1) que induce mutagénesis de un 27% a 88%. El AC (0.2 y 0.4 mM) resultó ser un efectivo antimutagénico contra la AFB1, ya que inhibió en 88% su capacidad mutagénica. En este mismo trabajo se utilizó el ensayo SMART en ala de *Drosophila melanogaster*. La cruza ST (0.25, 0.5 y 1 mM) reveló una ausencia de mutagénesis y toxicidad. Esto era de esperarse dado las bajas concentraciones ensayadas lo que generó la conclusión que el AC es un compuesto antimutagénico a esos niveles.

Toxicidad

Heres-Pulido et al. (2005) determinaron la toxicidad (CL₅₀) del AC (0, 16.9, 50.5 y 84.2 mg/ml) utilizando las líneas *flare* y *Oregon-flare* de *Drosophila melanogaster*. Los resultados obtenidos no muestran una clara respuesta ya que en la línea *flare* existió una CL₅₀ de 70.5 mg/ml y en la línea *Oregon-flare* existió una baja mortalidad que no permitió alcanzar cualquier valor de la CL₅₀.

Genotoxicidad

Duarte et al. (1999) utilizaron la prueba de Ames con las cepas TA98 y TA100 de *Salmonella thyphimurium* para evaluar la genotoxicidad de algunas de las moléculas fenólicas del café instantáneo, entre ellas el AC a (1 mM). Al añadir la fracción S9 en valores de pH cerca del valor 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, las moléculas fenólicas podrían estar implicadas en la genotoxicidad del café, vía especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés) debido a su autooxidación. Ojeda (2002) valoró el efecto genotóxico del AC usando el ensayo SMART en ala de *Drosophila melanogaster* utilizando la cruza HB. Los organismos se expusieron a distintas concentraciones de AC (27, 81 y 135 mM) y como testigo positivo se empleó el promutágeno uretano (20 mM). Los resultados fueron negativos, demostrando que en este ensayo esta cruza y con niveles altos y constitutivos de CYP450s el AC no es mutagénico, aun cuando se usaron altos niveles de este agente químico. Por lo anterior, se puede deducir que existió una selección de individuos. Szeto et al. (2002) probaron el efecto antioxidante del AC (1 mM) utilizando linfocitos humanos, los cuales fueron previamente incubados con peróxido de hidrógeno (H₂O₂) durante 30 minutos. Los resultados no evidenciaron una protección al H₂O₂, por el contrario, el AC a niveles tan bajos, aumentó los daños al ADN mostrando efecto genotóxicos por lo que se concluyó que hubo una sinergia entre los compuestos utilizados. Con el fin de contribuir a la valoración del AC a concentraciones tan altas como las que podrían producirse por la hidrólisis del verbascósido en el extracto natural de *Buddleja scordioides* Ortega (2004) determinó el efecto genotóxico del AC utilizando la prueba SMART en ala con la cruza HB. Las concentraciones utilizadas fueron de 57.8, 173 y 289 mM. Los resultados mostraron que el AC presenta un efecto

genotóxico débil en las concentraciones 57.8 y 173 mM. Es muy posible que la ausencia de genotoxicidad a 289 mM sea resultado de la toxicidad observada, ya que reporta poca sobrevivencia de los organismos.

Los resultados de Ojeda (2002) y Ortega (2004) son controversiales en el mismo ensayo por lo tanto era necesario evaluar dichas concentraciones con la craza ST que tienen niveles regulados de CYP450s.

TABLA I. ANTECEDENTES CON AC.

AUTOR Y AÑO	RESULTADOS
Hirose et al. 1998	El AC en roedores (2 mM) presenta efectos cancerígenos incrementando un 14.8 % la incidencia de papilomas en el estómago.
Ames y Gould, 1999	El AC se encuentra dentro de la lista de algunas sustancias con potencial genotóxico en roedores.
Duarte et al. 1999	En la prueba de Ames el AC (1 mM) está implicado en la genotoxicidad vía ROS.
Karekar et al. 2000	El AC presenta un efecto antigenotóxico en la prueba de Ames y SMART (0.2, 0.25, 0.4, 0.5 y 1 mM).
Ojeda, 2002	En el ensayo SMART en ala de <i>Drosophila</i> cruza HB (27, 81 y 135 mM) obtuvo respuesta negativa en las tres concentraciones.
Szeto et al. 2002	En el ensayo cometa en linfocitos humanos el AC (1 mM) presentó un efecto genotóxico.
Ortega, 2004	En el ensayo SMART en ala de <i>Drosophila</i> cruza HB (57.8, 173 y 289 mM) obtuvo un efecto genotóxico débil en las concentraciones 57.8 y 173 mM.
Heres-Pulido et al. 2005	En la CL ₅₀ en las líneas <i>flare</i> y <i>Oregon-flare</i> de <i>Drosophila melanogaster</i> (16.9, 50.5 y 84.2 mg/ml) obtuvieron una concentración letal de 70.5 mg/ml para la línea <i>flare</i> y en <i>Oregon-flare</i> la baja mortalidad no permitió alcanzar cualquier valor de CL ₅₀ .

JUSTIFICACIÓN

Dada la controversia existente con respecto a los efectos del AC y debido a que teóricamente éste puede ser liberado durante la hidrólisis del verbascósido por esterasas, es importante aportar la mayor cantidad de información para alertar sobre el posible daño del AC si el verbascósido se industrializara para ser utilizado como materia prima de un buen bloqueador solar. Además, éste trabajo contribuirá a determinar los efectos del AC con el ensayo SMART en el ala de *Drosophila melanogaster* cruza ST, por ser un compuesto cuya actividad antígenotóxica o genotóxica a diferentes concentraciones no ha sido claramente definida en esta prueba.

OBJETIVO

Valorar la actividad genotóxica del AC (0, 27, 57.8, 81, 135 y 173 mM) en la Cruza Estándar (ST) de *Drosophila melanogaster* en el ensayo SMART en ala.

HIPÓTESIS

Si el AC no presenta efecto genotóxico en este sistema de prueba con este modelo biológico entonces no habrá diferencias en la frecuencia de manchas entre el tratamiento testigo y los tratamientos experimentales. Por otra parte, si el AC tiene efecto genotóxico entonces habrá diferencias estadísticamente significativas en la frecuencia de manchas entre el tratamiento testigo y los tratamientos experimentales.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizaron las líneas *flare* ($flr^3/TM3$, Bd^S) y *multiple wing hairs* (mwh/ mwh) del Laboratorio de Genética Toxicológica de la F.E.S. Iztacala, U.N.A.M originalmente donadas por el Dr. U. Graf del Instituto Tecnológico (ETH) de Zürich, Suiza.

Se aislaron hembras vírgenes de la línea *flare* ($flr^3/TM3$, Bd^S) y machos de línea *multiple wing hairs* (mwh/ mwh) para realizar la cruce ST en medio de cultivo (Dueñas *et al.*, 2001). Posteriormente los adultos se trasvasaron a un medio con levadura fresca activada (durante 8 h a 25 °C y 65 % de humedad) para realizar la colecta de huevos por 8 h. Al final se devolvieron los frascos sólo con huevos a la incubadora alas mismas condiciones.

Tres días después se recuperaron larvas de 72 h +/- 4 h para tratamientos crónicos. Éstas pueden ser transheterocigotas con genotipo ($mwh flr^{3+} / mwh^+ flr^3$) y fenotipo silvestre (sin muescas en los bordes de las alas) y larvas heterocigotas con genotipo ($mwh flr^{3+}/TM3$, Bd^S) y fenotipo *Beaded-Serratia* (con muescas en los bordes de las alas). Se colocaron en tubos de ensayo con 0.5g de Instant Medium para *Drosophila melanogaster* (Carolina Biological Supply Co., Burlington NC, USA), 2ml de AC (0, 27, 57.8, 81, 135 y 173 mM) (CAS: 206-301-2) de Sigma (St Louis, MO, USA); como testigo negativo se utilizó agua desionizada y como testigo positivo metil metano sulfonato (MMS) (0.5 mM) (Fluka, CAS No 66-27-3, 98 % de pureza).

La recuperación de imagos se llevó a cabo 10 días después de la colecta de huevos, fijándolos en alcohol 70 %. Posteriormente se disectaron las alas de las moscas silvestres y se montaron en porta objetos con solución de Faure. Sólo se revisaron las alas de fenotipo silvestre que corresponden a larvas transheterocigotas. Las preparaciones se observaron al microscopio óptico 40X para identificar manchas sencillas (flr^3 o mwh) o gemelas (flr^3 / mwh) (Graf *et al.*, 1984).

Los datos se analizaron en el programa estadístico SMART (ji cuadrada para proporciones) (Frei y Würzler, 1988). Para corroborar los resultados no concluyentes obtenidos con SMART se utilizó la prueba de U Mann-Withney y Wilcoxon, con modificación para una cola para datos individuales (Frei y Würzler, 1995).

Se empleó para ello el programa estadístico STAT GRAFICS versión 6.0 para PC. En este caso, el diagnóstico estadístico es o no es significativo.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La variabilidad genética con respecto al metabolismo de los xenobióticos es un fenómeno bien conocido en *Drosophila*, como consecuencia de ello, la inducción de daño genético por xenobióticos que requieren ser biotransformados es dependiente del genotipo en esta especie (Jiménez y Merchant, 2003).

En la figura 11 y la tabla III se muestran las frecuencias de manchas por individuo que se analizaron con el control histórico del testigo agua para de la cruza ST obtenida en el laboratorio de Genética Toxicológica de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, con los resultados de 30 experimentos independientes.

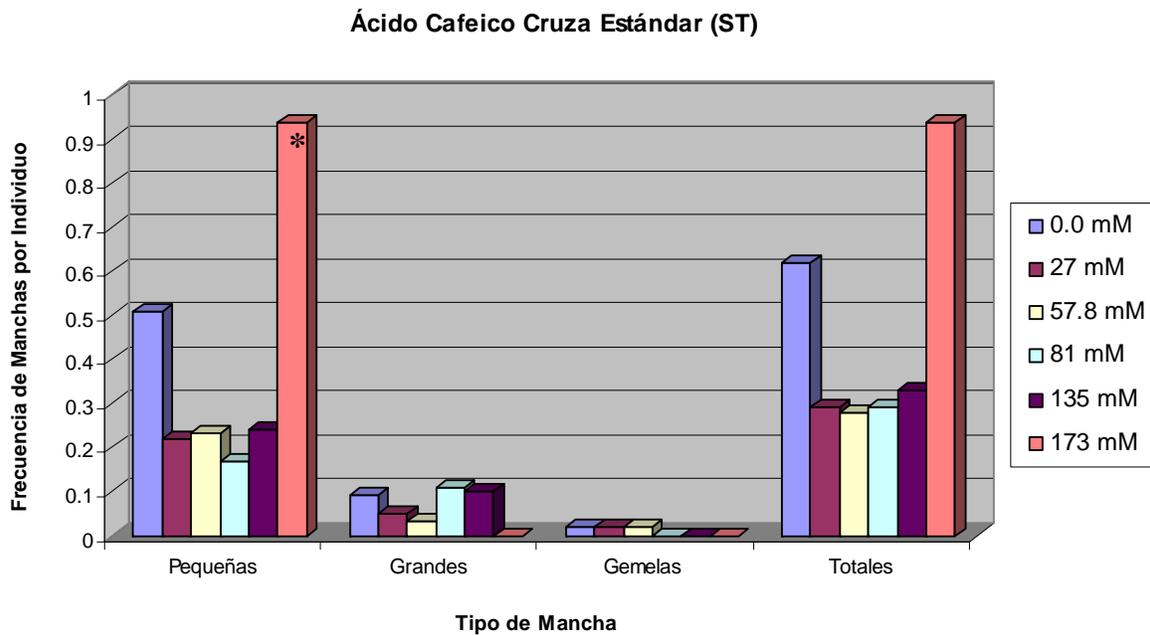


Figura 11. Frecuencia de manchas por concentración de AC.

***Resultado estadísticamente significativo.**

La concentración 173 mM resultó positiva para manchas pequeñas; el resto de las concentraciones y los diferentes tipos de manchas resultaron negativos o indecisos para el ensayo SMART (ji cuadrada para proporciones).

Tabla III. Resultados SMART para AC.

			Frecuencia de manchas por individuo (número de manchas por mosca). Diagnóstico estadístico*, ^a			
Compuesto	Concentración mM	Número de individuos	Manchas pequeñas (1-2 células) m=2	Manchas grandes (> de 2 células) m=5	Manchas gemelas m=5	Manchas totales m=2
Control	0.0	549**	0.51 (279)	0.09 (49)	0.02 (11)	0.62 (339)
Ácido cafeico	27	58	0.22 (13)-	0.05 (3)-	0.02 (1)-	0.29 (17)-
	57.8	60	0.23 (14)-	0.03 (2)-	0.02 (1)-	0.28 (17)-
	81	35	0.17 (6)-	0.11 (4)-	0.00 (0)-	0.29 (10)-
	135	21	0.24 (5)-	0.10 (2)-	0.00 (0)i, ns	0.33 (7)-
	173	17	0.94 (16)+	0.00 (0)-	0.00 (0)i, ns	0.94 (16)i, ns
MMS	0.5	60	9.15 (549)+	8.88 (533)+	3.72 (223)+	21.75 (1305)+

*Diagnóstico estadístico de acuerdo a Frei y Würigler (1988). Donde: m: Factor de multiplicación i: indecisos -: negativo; Prueba estadística de una cola. Niveles de probabilidad de α y β ; resultados positivos: + ($\alpha = 0.05$); resultados negativos: - ($\beta = 0.05$). ^a Prueba de U de Mann-Whitney y Wilcoxon utilizada para corroborar los resultados no concluyentes o indecisos de la prueba SMART (Frei y Würigler, 1995). Donde: ns: no significativo.

**Control histórico de la cruz ST del Laboratorio de Genética Toxicológica de la FES-Iztacala, UNAM correspondiente a 30 experimentos independientes.

Se aplicó la prueba de U de Mann-Whitney y Wilcoxon (Frei y Würgler, 1995) para discernir los resultados no concluyentes o indecisos para las manchas gemelas y totales y comprobar el resultado positivo arrojado por el análisis SMART.

La prueba reveló que los resultados no concluyentes fueron negativos y se comprobó el efecto positivo de la concentración 173 mM para manchas pequeñas.

Por lo tanto, el análisis del ensayo SMART en la cruce ST, con niveles regulados de CYP450, mostró que el AC presenta un efecto positivo para clones pequeños en la concentración 173 mM, lo cual indica un daño y un posible riesgo a esta concentración.

En cuanto a las concentraciones 27, 57.8, 81 y 135 mM (tabla III) se observa que la frecuencia de manchas pequeñas se encuentra por debajo de la frecuencia del control agua. Para corroborar si estos datos son estadísticamente significativos se realizó el ensayo SMART utilizando las frecuencias de los datos experimentales como control y la frecuencia de los datos del agua como experimentales comprobando que efectivamente existe una significancia estadística para todas las concentraciones.

Estos resultados indican que pudiera existir un efecto protector por parte del AC, sin embargo, relacionando el bajo número de individuos que se obtuvieron al aumentar las concentraciones se puede deducir que este compuesto presenta efectos citotóxicos.

Para demostrar la relación que existe entre el bajo número de individuos y la frecuencia de manchas pequeñas al aumentar las concentraciones del AC se elaboró una gráfica de porcentaje de mortalidad (Figura 12) y, considerando que el AC fuera un metabolito del verbascosido el cual se ha propuesto como componente de un filtro solar, se realizó la conversión de mM a mg/ml de esta manera se puede realizar una comparación con los resultados de la CL_{50} para la línea *flare* (Figura 13) en (Heres-Pulido *et al.*, 2005).

Se observa un comportamiento similar tanto en la cruce ST como en la línea *flare*: al aumentar las concentraciones del AC la tasa de mortalidad se incrementa de manera cuadrática.

Cruza ST

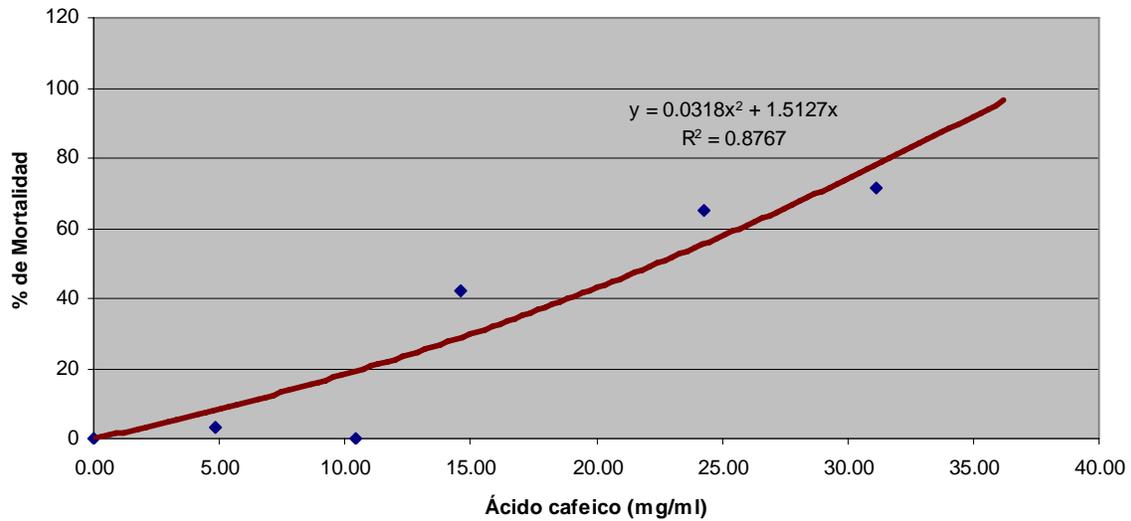


Figura 12. Porcentaje de mortalidad de la cruza ST de *Drosophila melanogaster* tratada con AC (0, 4.86, 10.41, 14.59, 24.32 y 31.17 mg/ml)

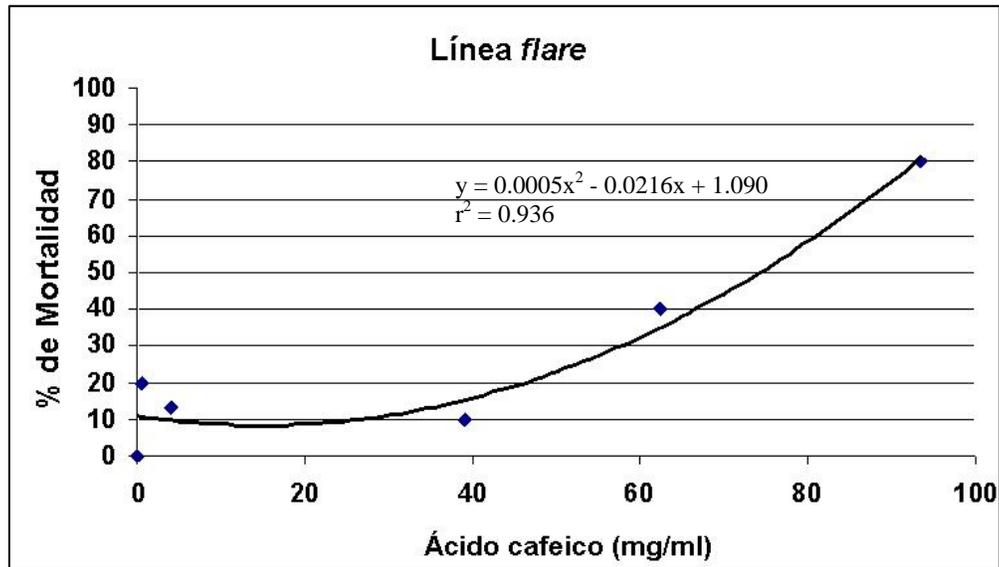


Figura 13. Porcentaje de mortalidad de la línea *flare* de *Drosophila melanogaster* tratada con AC (0, 0.39, 3.9, 39, 62.4 y 93.6 mg/ml) (Tomada de Heres-Pulido *et al.*, 2005).

Lo anterior pudiera deberse al complejo enzimático CYP450 que es sobrepasado y no alcanza a eliminar y llevar a cabo la desintoxicación del AC.

Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Ojeda y Ortega quienes utilizaron la cruza HB del ensayo SMART, que presentan un comportamiento similar a los obtenidos en la CL₅₀ para la línea Oregon-*flare* (Heres-Pulido *et al.*, 2005). Este comportamiento

está relacionado con una eficiente respuesta de desintoxicación del AC por parte del complejo enzimático CYP450 que se encuentra en niveles constitutivos en esta cruz.

La figura 14 muestra la frecuencia y distribución de clones *mwh* dependiendo del tamaño por número de células. Se encontró una diferencia estadísticamente significativa en las manchas con una célula en la concentración 173 mM y la ausencia de diferencias estadísticamente significativas en el resto de las concentraciones (27, 57.8, 81 y 135 mM) con respecto a la disminución exponencial de la mancha.

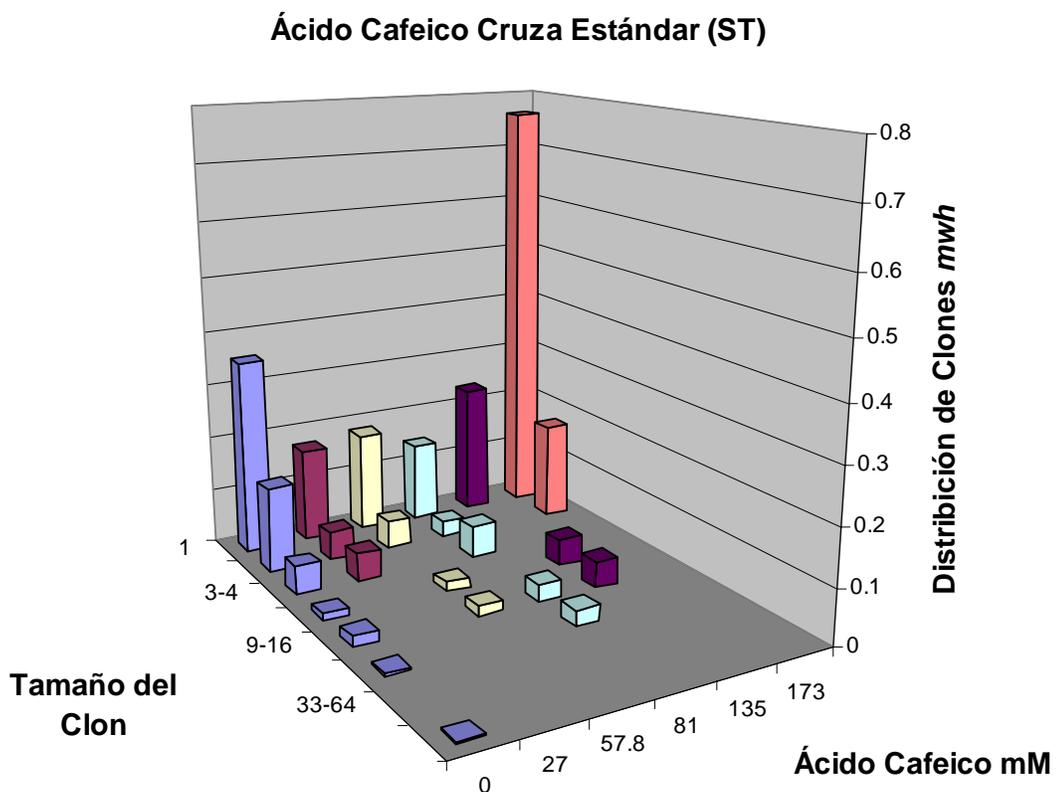


Figura 14. Distribución de clones *mwh* por tamaño y frecuencia por exposición a diferentes concentraciones de AC.

Lo cual indica que el daño del AC se manifestó como manchas pequeñas de una célula debido a posibles efectos citotóxicos o citostáticos que inhibieron el crecimiento y división celular (Beutler, 1992; Gray *et al.*, 1988).

La probabilidad de que una determinada sustancia cause un daño depende inevitablemente de diversas variables como el nivel de exposición del organismo a la sustancia, la distribución y retención de ésta una vez que ha penetrado en el cuerpo, la eficiencia de los sistemas de activación metabólica y/o la detoxificación de los órganos y la reactividad de la sustancia con macromoléculas de las células (Gray *et al.*, 1988).

CONCLUSIONES

1. El AC presenta efectos tóxicos en las concentraciones utilizadas en este trabajo (27, 57.8, 81, 135 y 173 mM) en la cruza ST del ensayo SMART en ala de *Drosophila melanogaster*. Este efecto se refleja tanto en el número de individuos como en el número de manchas ya que a mayor concentración de AC se incrementó la mortalidad de los individuos por lo que quizá sólo sobrevivieron los individuos resistentes.
2. En cuanto a la frecuencia de manchas pequeñas en las concentraciones 27, 57.8, 81 y 135 mM, aunque no presentaron una significancia estadística con respecto a la frecuencia de manchas pequeñas del control agua se concluye que esto se debe a que existió un daño celular de tipo citotóxico o citostático.
3. El complejo enzimático CYP450 es la primera defensa del sistema de biotransformación del metabolismo de los xenobióticos, la cruza ST de *Drosophila melanogaster* presenta niveles regulados de este complejo enzimático. Bajo las condiciones experimentales de este estudio los resultados señalan a la posibilidad de que el sistema CYP450 fue superado por el AC (173 mM) lo que provocó que existiera un daño que se expresó como manchas pequeñas.

ANEXO 1

FILTROS SOLARES

Los filtros solares son sustancias que se aplican directamente sobre la piel para evitar los efectos nocivos de las radiaciones solares (García, 1998).

Los primeros filtros que se diseñaron se encaminaban a permitir el bronceado sin tener que pasar primero por el eritema o irritación cutánea, o dicho de otro modo, permitían el paso de los rayos UVA, pero impedían el paso de los UVB, que son los responsables de las quemaduras solares (García, 1998).

Actualmente, sin embargo, se considera un buen filtro solar aquel que es capaz de prevenir los efectos inmediatos del Sol (quemadura solar por los rayos UVB), así como los efectos tardíos como el fotoenvejecimiento producido por los rayos UVA (García, 1998).

Los filtros solares se pueden clasificar en dos grandes grupos: Filtros físicos y químicos.

Filtros físicos, inorgánicos o pantalla total:

Son sustancias inertes que aplicadas en la piel reflejan la luz solar como un espejo (no absorben la radiación). Son mucho más efectivas en cuanto a la protección porque protegen de todo el espectro solar y tienen menos riesgo de alergia, pero son menos cosméticas por dejar una fina capa blanquecina sobre la piel (los fotoprotectores físicos presentan la ventaja de que puede verse fácilmente la zona donde han sido aplicados), por ello, están especialmente indicados en niños. Los filtros físicos son sustancias impermeables a la radiación solar (habitualmente polvos minerales) y los más utilizados son la mica, el dióxido de titanio, petrolato rojo, el óxido de zinc o de hierro, salicilatos, cloruro férrico e ictiol, el talco, etc. En raras ocasiones producen dermatitis de contacto o fotocontacto (García, 1998; Duro *et al.*, 2003).

Los recientes preparados micronizados son suspensiones de finas partículas que superan el problema de los preparados antiguos que debían aplicarse en capa gruesa y eran opacos, además de poco cosméticos. Cuando se dice que un filtro es pantalla total quiere

decir que protege frente a los rayos UVA, UVB y UVC, independientemente del factor de protección que tenga frente a cada una de estas radiaciones.

Muchos productos comercializados combinan estas dos modalidades de fotoprotección. Actualmente todos los envases de los fotoprotectores comercializados deben indicar claramente el tipo de filtro que es y el espectro de absorción al que protegen (Duro *et al.*, 2003).

Estos filtros son los que más radiación frenan, por tanto sus niveles de FSP (Filter Sunny Protection o Filtro de Protección Solar) son muy altos (18 en adelante).

Fotoprotectores químicos u orgánicos:

Son sustancias que aplicadas en la piel absorben los fotones de la luz solar, a través de reacciones fotoquímicas, y los modifica para que no perjudiquen la piel. Necesitan unos 30 minutos para hacer efecto, por lo que no es suficiente aplicarlas inmediatamente antes de tomar el sol. Dado que se absorben en la piel, tienen más riesgo de alergia, por lo que su uso está restringido en los niños. De todas formas, son los fotoprotectores más usados por que son los más cosméticos (Duro *et al.*, 2003).

Las sustancias más utilizadas son el PABA y sus derivados, las benzofenonas y los cinamatos, los derivados de dibenzoilmetano, el ácido 2-fenil 5- benzimidazol sulfónico, que son selectivas para una determinada longitud de onda del espectro lumínico.

En función de la cobertura del espectro solar se subclasifican en:

- **Fotoprotectores químicos de protección limitada** (*Agentes preventivos sólo de las quemaduras solares*): Sólo protegen de los rayos ultravioleta tipo B. Por lo tanto, no cubren todo el espectro de la radiación solar. Son los filtros selectivos en los que el máximo de absorción se sitúa entre los 290 y 320 nm. Sólo evitan el riesgo de quemaduras solares, pero no los efectos de los rayos ultravioletas tipo A. El ejemplo de este tipo de sustancias es el PABA y derivados.
- **Fotoprotectores químicos de protección amplia** (*Agentes preventivos de quemaduras y bronceado*) protegen al mismo tiempo los UVB y UVA, por lo que previenen las quemaduras y protegen de las fotodermatitis, el

envejecimiento cutáneo y el cáncer de piel. El ejemplo más conocido es la benzofenona.

Los filtros se diferencian unos de otros por el factor de protección solar (FPS) que es el índice que mide la capacidad protectora de un filtro frente a los efectos nocivos de la radiación solar sobre la piel y nos indica el tiempo que la piel puede estar al sol sin que aparezca enrojecimiento o se produzca una quemadura. Así por ejemplo, un producto solar que ofrezca un factor de protección 15, significa que la piel así protegida puede estar expuesta a los rayos UVB 15 veces más tiempo que la misma piel sin protección solar. Así pues, para una persona cuya piel se quema a los 10 minutos, cuando se aplica un fotoprotector 15, tarda en quemarse en 150 minutos. Por lo tanto, conviene saber que cuando más elevado sea el factor de protección, más tiempo de protección presenta, y no indica el grado de permisividad al bronceado (Duro *et al.*, 2003).

El FPS no es un valor absoluto; es simplemente un dato orientativo que permite saber al usuario sobre el margen de tiempo adicional que puede estar expuesto al sol sin experimentar quemaduras. Existen muchos factores que pueden distorsionar el valor del FPS; no sólo los inherentes a las características de la radiación y al tipo de piel, sino también los relativos al tipo de filtro: capacidad de penetración cutánea, resistencia al agua y sudor y modo de aplicación. En efecto, según el espesor de la capa de filtro solar aplicada sobre la piel, el poder de protección puede variar sensiblemente (Duro *et al.*, 2003).

El factor de protección solar (en muchos envases indicado con las siglas FPS o SPF). Para añadir más confusión y desconcierto, el cálculo de este número puede ser por métodos distintos, de un laboratorio farmacéutico a otro, en función de la cantidad de producto aplicado por unidad de superficie y el tipo de fuente lumínica utilizable, lo que determina que estos productos no sean comparables (Duro *et al.*, 2003).

ANEXO 2

Drosophila melanogaster

La selección de un organismo específico para realizar estudios genéticos depende de las ventajas que éste presente para la realización de la investigación deseada. La mosca del vinagre *Drosophila melanogaster* (Figura 17) resulta un excelente organismo eucariota para experimentación en Genética. Tiene las siguientes ventajas: 1) ciclo vital relativamente corto (10-14 días) a 25° C, 2) fácil cultivo en botellas o tubos de vidrio con un medio barato y sencillo de preparar, 3) gran fertilidad (una pareja produce varios cientos de descendientes), 4) número cromosómico bajo (4 pares), 5) gran número de caracteres heredables que afectan la morfología del adulto y 6) genoma totalmente secuenciado; ahora se sabe que más del 60 % de los genes implicados en enfermedades humanas tienen ortólogos en *Drosophila* y un 25.5% de sus proteínas son similares en un 80% de sus secuencias (Adams, 2000).

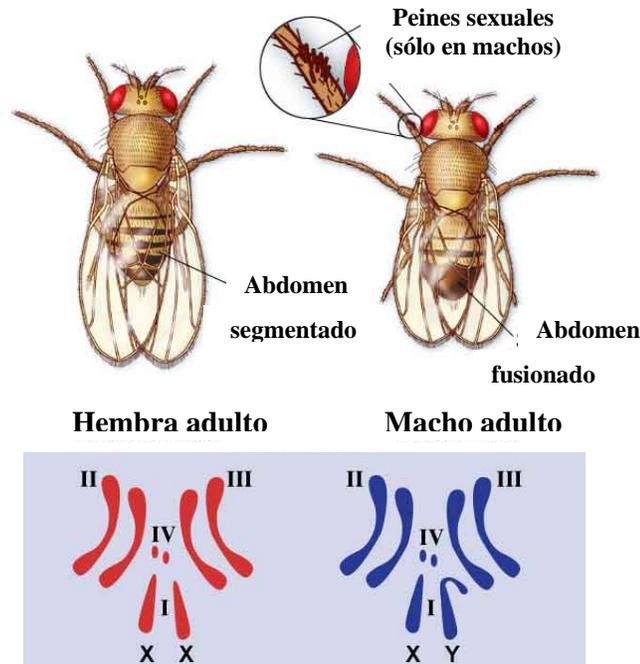


Fig 17. *Drosophila melanogaster*
(Tomado de www.mu.ca-biogy-drosophila.com/4html).

El ciclo de vida de *Drosophila* consiste de varios estadios de desarrollo distintos (Figura 18). Después de que el óvulo es fecundado ocurre un periodo de embriogénesis durante el cual el cigoto se convierte en una forma inmadura conocida como larva. Después de la eclosión, cada larva experimenta varias mudas. Cada muda permite un incremento de

tamaño hasta que la larva está lista para transformarse en pupa. La pupación implica una muda y el endurecimiento de la nueva cutícula externa, de modo que la pupa queda por completo encapsulada. El insecto sufre entonces una metamorfosis completa. En este tiempo la mayor parte de los tejidos larvales degeneran y otros se diferencian (discos imagales) para formar los órganos de la mosca (imago) (Villem, 1998).

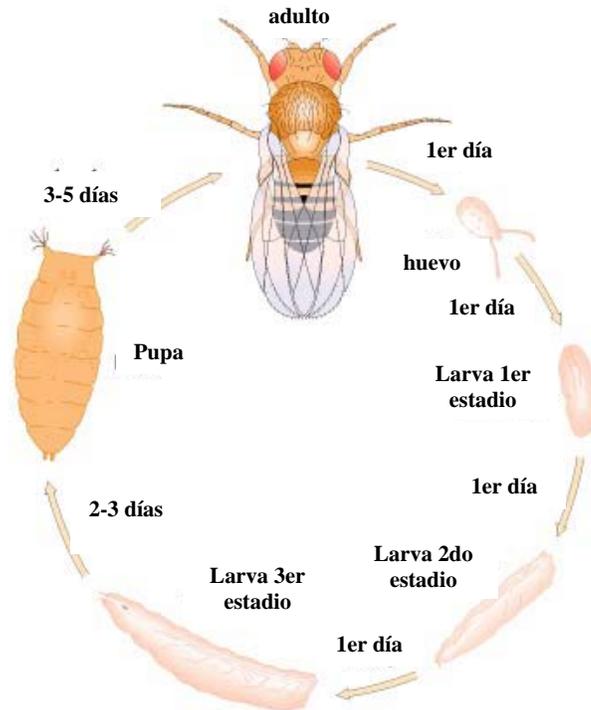


Fig 18. Ciclo de vida de *Drosophila melanogaster*
(Tomado de www.mu.ca-biogy.drosophila3.com/html).

Los discos imagales son bolsas epiteliales de alrededor de 20 a 50 células que permanecen indiferenciadas durante el estadio embrionario y larvario pero durante la metamorfosis dan origen a estructuras que conformarán al organismo adulto tales como: antenas, patas, ojos, alas, etc. (Figura 19). De tal manera que, si ocurriera daño genético en una de estas células, éste se expresará en el adulto, como un clon de células mutantes en el tejido (Graf, *et al.*, 1984).

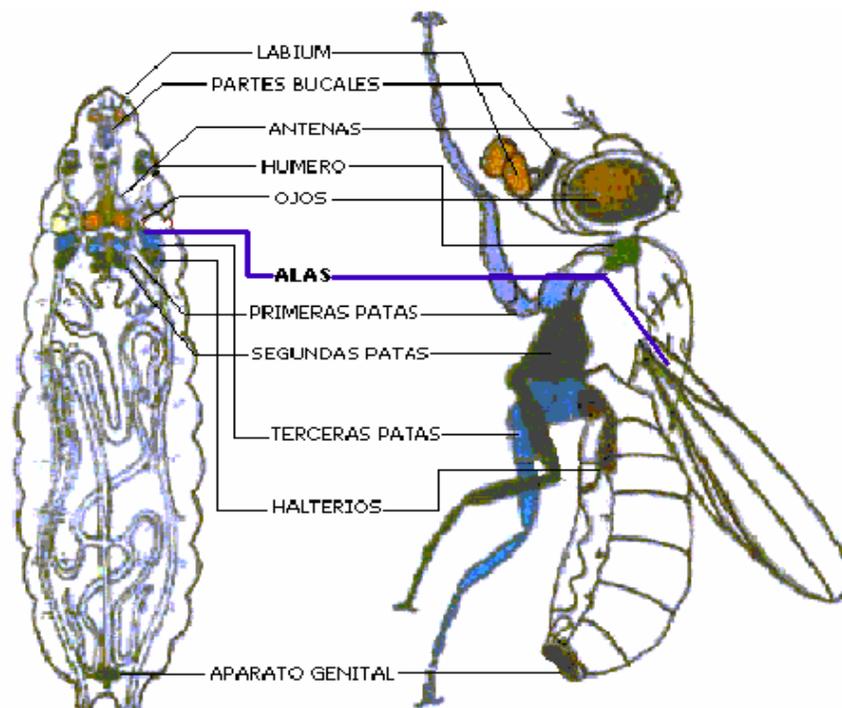


Figura 19. Discos imaginales de la larva que en la metamorfosis se estimulan y diferencian para formar las estructuras del cuerpo del adulto: antenas, ojos, patas, genitales externos, alas, etc. (Tomado de Lawrence, 1992).

REFERENCIAS

ADAMS, M., CELNILHER, S. HOLT, R. (2000). The genomic sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science* **287**: 2185-2195.

AMES, B. N. GOULD, L. S. (1999). Nueve ideas recibidas pasadas por la criba de la ciencia. *Mundo Científico* **207**: 31-37.

ÁVILA-ACEVEDO, G. (2002). Estudio fitoquímico de *Buddleja perfoliata* y *Buddleja scordioides*, evaluación de la actividad antibacteriana y fotoprotectora de sus principales metabolitos secundarios. Tesis de doctorado. UNAM. México.

BEUTLER, E. (1992). The molecular biology of G6PD variants and other red cells defects. *Annu Rev Med.* **43**: 47-59.

BOELSTERLI, U.A. (2003). Mechanistic Toxicology. The molecular basis of how chemicals disrupt biological targets. 2nd. Taylor and Francis. London . Pp. 51-52.

BURELL, R. (1993). Human immune toxicity. *Mol. Aspects Med.* **14**: 1-8.

Consejo de la Salud de los Países Bajos. (1994). Comité para la Evaluación de Carcinogénesis de las Sustancias químicas. Risk Assessment of Carcinogenic Chemicals in the Netherlands. *Regul Toxicol. Pharmacol.* **19**: 14-30.

CÓRDOBA, D. (2001). Toxicología. El Manual Moderno. 4ª. ed. Madrid, España. Pp: 198-199.

DELGADO, R. A., ORTIZ, M. R., GRAF, U., VILLALOBOS, P. R. and GÓMEZ, A. S. (1995). Genotoxic activity of environmentally important polycyclic aromatic hydrocarbons and their nitro derivatives in the Wing Somatic Mutation and Recombination Test (SMART) in *Drosophila melanogaster*. *Mutat. Res.* **245**: 41-46.

- DOWDESWELL, E. (2004). Ozone. *Industry and Environment* **53**: 1-24.
- DUARTE, M. P., LAIRES, A., GASPAR, J., LEO, D., OLIVIERA, J. S. and RUEFF, J. (1999). Genotoxicity of instant coffee: possible involvement of phenolic compounds. *Mutat. Res.* **442**: 43-51.
- DUEÑAS, I. E., M. E. HERES, P. L. CASTAÑEDA GRAF, U. (2001). Easy raising of *Drosophila melanogaster* on a medium consisting of mashed potato flakes and a preservative solution. *Dros Infor Ser.* **84**: 106.
- DURO, E., AMPILLOS, M. and AUSIN, S. (2003). El sol y los filtros solares. *Medifam.* **13**:159-165.
- FERNÁNDEZ, G. (1994). La pérdida de ozono en la estratosfera y su repercusión en piel. *Dermatología Rev. Mex.* **38**: 121-124.
- FRANKLIN, S., MICHAEL, R. YOST, L. and GAROLD, T. (2000). Principles of Toxicology. 2nd. ed. John Wiley and Sons, Inc. USA. Pp: 57-85.
- FREEMAN, S., HACHAM, H., GANGE, R., MAYTUM, D., SUTHERLAND, J. and SUTHERLAND, B. (1989). Wavelength dependence of pyrimidine dimer formation in DNA of human skin irradiated *in situ* with ultraviolet light. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **88**: 5605-5609.
- FREI, H. WÜRGLER, F. E. (1995). Statistical methods to decide whether mutagenicity test data from *Drosophila* assays indicate a positive, negative or inconclusive result. *Mutat. Res.* **203**: 225-308.
- GARCÍA, B. A. (1998). Evaluación de un filtro solar de *Yucca filitera*. Tesis, UNAM-Campus Iztacala. Tlanepantla, Edo. Méx.

GONZÁLEZ, F. J. (1992). Human cytochromes P450: Problems and prospects. *Tend Pharmacol Sci.* **13**: 346-352.

GRAF, U., WÜRGLER, F. E., KATZ, A. J., FREI, H., JUON, H; HALL, C. B. and KALE, P.F. (1984). Somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Enviromental mutagenesis* **6**:113-188.

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

GRAF, U. (1996). The Wing Somatic Mutation and Recombination Test (SMART) 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 Enviromental Mutagen Society (PAEMS). 23-25 Jan. 1996. Manuscript for the African Newsletter On Ocupational Health and Safety.

GRAY, L., OSTBY, R., FERREL, R. and LINDER, J. (1988). The development of a protocol to assess reproductive effects of toxicants in the rat. *Rev.Toxicol.* **2**: 281-287.

GRIFFIN, M.E., BOURGET, T.D. and LOWE, N.J. (1997). Sunscreens: Development evaluation and regulatory aspects. Marcel Dekker. New York. Pp: 499-512.

GUTIÉRREZ, R. (2003). La piel humana. 3^a. ed. Raven Press. NY. USA. Pp: 3-4.

GUZMÁN-RINCÓN, J. GRAF, U. (1995). *Drosophila melanogaster* somatic mutation and recombination test. En: Biomonitoring and biomarkers as indicators of environmental change: a handbook. Ed. F. M. Butterworth., L. D. Corleun and Guzman-Rincon, J. Plenum Publishing Corp. Pp 169-181.

HAYES, A. W. (1988). Principles and Methods of Toxicology. 2nd. ed. Raven Press. New York USA. Pp 31- 37.

HERES-PULIDO, M. E., ÁVILA-ACEVEDO, G., DIONICIO-LÓPEZ, H., HERNÁNDEZ-PORTILLA, G. L. B., CASTEÑEDA-PARTIDA, L., GARCÍA-BORES, A.M., MARTÍNEZ-CORTÉS, G., CÁRDENAS, S. L, CERÓN, G., TAVERA-BRISEÑO, K., VARGAS-VERA, A. DUEÑAS-GARCÍA, I.E. (2005). Non toxicity of phenylpropanoid verbascoside from a *Buddleja scordioides* extract in *Drosophila melanogaster flare* and Oregon-*flare* strains and toxicity of caffeic acid in the *flare* strain. *Dros. Inf. Serv.* **88**: 102-109.

HIROSE, M., TAKESADA, Y., TANAKA, H., TAMANO, S., KATO, T. and SHIRAI, T. (1998). 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. *Carcinog.* **19**: 207.

JIMÉNEZ, L. F., and MERCHANT, H. (2003). *Biología Celular y Molecular*. Prentice Hall. México. Pp 774-780.

KAREKAR, V., JOSHI, S. and SHINDE, S.L. (2000). Antimutagenic profile of three antioxidants in the Ames assay and the *Drosophila* wing spot test. *Mutat. Res.* **10**: 94-183.

LARSON, R. (1988). The antioxidants of higher plants. *Phytoche.* **27**: 969-978.

LAWRENCE, P.A. (1992). The marking of fly, the genetics of animal design. Blacwell Scientific Publication. U.S.A. Pp 35-39.

McKINNON, R. and EVANS, A. (2000). Pharmacogenetics. *Hosp. Pharm.* **30**: 102-105.

MADHUKAR, A. (1992). Sunscreens: Principles of photoprotection. In: Pharmacology of the skin. CRC Press Series in Pharmacology and Toxicology. NY. USA. Pp: 230-247.

MURRAY, R., GRANNER, D., MAYES, P. and RODWELL, P. (1992). *Bioquímica de Harper*. Manual Moderno. 12a. ed. Pp: 156-660.

OJEDA, D. J. (2002). Valoración de la genotoxicidad del ácido cafeico en la cruce Bioactivación Elevada de *Drosophila melanogaster* en la prueba SMART. Tesis. UNAM FES Iztacala Edo. Méx. 29 pp.

ORTEGA, C. D. (2004). Contribución a la valoración del efecto genotóxico del ácido cafeico en *Drosophila melanogaster* con SMART en ala. Tesis. UNAM. FES Iztacala Edo. Méx. 40pp.

PODOLSKY, J. (2001). Situación actual de la fitoterapia. Propiedades Biológicas de Principios Activos de Origen Vegetal Contenidos en Propóleos.
www.inta.gov.ar/apinet/congreso/c04.pdf.

RAMOS, P (1993). Manual de laboratorio de *Drosophila melanogaster*. Mcgraw-Hill. México.

SAFFRON, L. (2000). Organic Food and Cancer Risk. Vancouver.
www.positivehealth.com/Articles/Organic%20and%20Vegetarian/safron30.html

SANTIAGO, C., BANDRÉS, F. y GÓMEZ-GALLEGO, F. (2002). Polimorfismos del citocromo P450: Papel como marcador biológico. *Medicina del Trabajo* **11**: 130-140.

SZETO, I., T. COLLINS, A. R. and BENZIE, I. F. F. (2002). Effects of dietary antioxidants on DNA damage in lysed cell using a modified comet assay procedure. *Mutat. Res.* **500**: 31-38.

TIJEL, N., HELVIG, C. FEYEREISEN, R. (2001). The cytochrome P450 superfamily in *Drosophila melanogaster*. Annotation, intron-exon organization and phylogeny, *Gene*. **262**: 189-198.

TURUEL, J. A. (2001). Medio Ambiente y Vida Saludables. *Ciencia y Salud* **44**: 5-8.

VANBESIEN, E. and MARQUES, M. P. M. (2003). Ab initio conformational study of caffeic acid. *Journal of Mole. Struct.* **625**: 265-275.

VOGEL, E.W. (1991). Genotoxic chemicals. An introduction into principles of genetic toxicology. Apuntes del Primer Taller Latinoamericano en Genética Toxicológica en *Drosophila melanogaster*. Tlaxcala, México. Sin Publicar.

VILLEE, C. (1998). Biología de Villee. McGraw-Hill Interamericana. 4^a ed. México. Pp. 369.

WEGENER, T. y FINTELMAN, V. (2000). Plantas Medicinales. *Plant. Med.* **24**: 344-356.

WULF, H.C., STENDER I.M. and LOCK-ANDERSON, J. (1997). Photodermatol. Photoimmunol. *Photomed.* **13**: 129-132.

www.mogensgallardo.com/p450/estructu.html.

www.mu.ca-biogy-drosophila.com/4html.

www.mu.ca-biogy-drosophila3.com/html.