



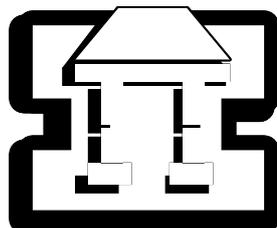
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
IZTACALA

EVALUACIÓN DE LA INTERACCIÓN DEL MMS, FeSO_4
Y VITAMINA C CON LA PRUEBA SMART EN ALA
DE *Drosophila melanogaster*

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
B I Ó L O G O
P R E S E N T A :
DIANA MARÍA ARISTA DOMÍNGUEZ

DIRECTORA DE TESIS:
M. EN C. MARÍA EUGENIA ISABEL HERES Y PULIDO



LOS REYES IZTACALA, EDO. DE MÉXICO

2008



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS

A la M. en C. María Eugenia Herej y Pulido

Por ser parte fundamental en mi formación profesional, que a pesar de que no me conocía confió en mí y me brindó apoyo, comprensión y paciencia. Y por ser una persona de carácter, enérgica y responsable.

A la M. en C. Irma Elena Dueñas García

Por no dejarme leer las letras pequeñas del “contrato”, porque al conocerla me permitió ser parte del Laboratorio de Genética Toxicológica y por explicarme n-veces lo que requería entender.

A la M. en C. Maria de Jesús Laura Castañeda

Por hacer los momentos difíciles divertidos, que en todo momento se encontraba dispuesta para asesorarme y por estar al pendiente del material que se necesitaba.

Dr. Ignacio Peñaloza Castro y Biol. Antonio E. Cisneros Cisneros

Que a pesar de los compromisos que les atañen tuvieron tiempo para asesorarme y revisar mi tesis, enriqueciendo su contenido con su opinión.

M. en C. Ángel Duran

Por la colaboración en parte del análisis estadístico.

A mis compañeras

Soledad, que me apoyo desde que la conocí; Karina, por la ayuda que constantemente me otorgo y por sus “locuras”; Rosa, por tener un buen comentario en el momento más oportuno; Rocío, que nos animaba con sus bromas y al “Dr.” Luis Felipe por ayudarme, explicarme y por ser una excelente persona.

Alejandra Alcántara Correa

Porque siempre confía en mí, me proporciona su alegría, apoyo, paciencia, perspicacia y sobre todo su amistad, porque en momentos difíciles siempre cuento con ella. Eres una excelente amiga.

Fabiola Y. Hernández Álvarez

Por tu amistad, confianza, buen juicio, tolerancia, sinceridad y porque siempre me apoyaste para culminar con la carrera.

DEDICATORIAS

A mis padres

María de Jesús Domínguez Rojas y Lino B. Arista Recillas

Que son los pilares de mi vida y mi familia.

Por la confianza, el apoyo incondicional, los desvelos, la dedicación y la entereza que me brindan; porque creen en mí y siempre tengo un consejo en el momento más adecuado. Que a pesar de las adversidades y los instantes difíciles que hemos vivido, me dieron su mano y nunca dejaron que me derrumbara.

Que me enseñaron, que estoy aquí y ahora para disfrutar cada segundo; que el estar viva no solo implica la parte fisiológica, sino que es el hecho de ser feliz, luchar por alcanzar mis metas y conseguir lo mejor de la vida.

A mis hermanos

Adam, David e Iván

Por que me demostraron que puedo contar con ustedes eternamente y jamás olvidare las ocasiones me ayudaron, ni ese sentido del humor que los caracteriza.

ÍNDICE

Resumen

1. Introducción	1
1.1 Metil MetanoSulfonato (MMS)	1
1.2 Vitamina C (VC)	4
1.3 FeSO ₄ y el Ión Fe ⁺	5
1.4 Especies Reactivas de Oxígeno (ROS)	7
1.5 Prueba de mutación y recombinación somática (SMART)	8
2. Objetivos	10
2.1 Objetivo general	10
2.2 Objetivo particular	10
3. Hipótesis	10
4. Materiales y métodos	10
4.1 MMS, VC, FeSO ₄ Y DIM	10
4.2 Cultivo y colecta de huevos de las líneas de <i>Drosophila melanogaster</i>	11
4.3 Obtención de larvas y tratamientos	11
4.4 Preparaciones permanentes	12
4.5 Registro de la frecuencia de manchas por individuo	12
4.6 Análisis estadístico	13
5. Resultados	13
5.1 Frecuencia de manchas	13
5.2 Tamaño del clon <i>mwh</i>	17
5.2.1 Testigos negativos	17
5.2.2 MMS y cotratamientos	17
6. Discusión	18
6.1 Testigos	18
6.2 Cotratamientos	19
7. Conclusiones	22
APÉNDICE 1. Líneas y marcadores	23
APÉNDICE 2. Resultados de la “Prueba de U”	25
Referencias	28

LISTA DE FIGURAS

Fig. 1	Metil MetanoSulfonato.	1
Fig. 2	Sitios de metilación en las bases del ADN por MMS.	2
Fig. 3	Esquema general de la reparación por escisión de bases (BER).	3
Fig. 4	Reacción reversible de óxido-reducción del ácido L-ascórbico.	4
Fig. 5	El ácido ascórbico es oxidado a radical ascorbil y después transformado en ácido dehidroascórbico.	5
Fig.6	Reacción de Fenton.	6
Fig. 7	Eventos genéticos que llevan a la pérdida de heterocigosis en <i>Drosophila melanogaster</i> y su expresión fenotípica.	9
Fig. 8	Tratamientos y obtención de larvas de 72+4h.	11
Fig. 9	Preparación permanente de las alas del fenotipo silvestre c/clave.	12
Fig. 10	Regiones del ala de <i>Drosophila melanogaster</i> .	12
Fig. 11	Expresión fenotípica de <i>mwh</i> .	23
Fig. 12	Expresión fenotípica de <i>flr³</i> .	23
Fig. 13	<i>D. melanogaster</i> con alas aserradas.	23

LISTA DE GRÁFICAS

Gráfica 1.	Frecuencia de manchas pequeñas, grandes, gemelas y totales de los testigos y cotratamientos para la cruza E.	16
Gráfica 2.	Frecuencia de manchas pequeñas, grandes, gemelas y totales de los testigos y cotratamientos para la cruza BE.	16
Gráfica 3.	Distribución de tamaños de clones <i>mwh</i> por individuo de la cruza E.	17
Gráfica 4.	Distribución de tamaños de clones <i>mwh</i> por individuo de la cruza BE.	18

LISTA DE CUADROS

I	Diseño experimental para los testigos y cotratamientos.	11
II	Resumen de los resultados obtenidos en el ensayo de ala de <i>Drosophila melanogaster</i> (SMART), alimentadas con DIM al que se añadió agua (H ₂ O) Vitamina C (VC) o Sulfato de hierro (FeSO ₄). El testigo MMS muestra una frecuencia mayor en todos los tipos de manchas.	14
III	Resumen de los resultados obtenidos en el ensayo de ala de <i>Drosophila melanogaster</i> (SMART), alimentadas con DIM al que se añadió Metil MetanoSulfonato (MMS), Vitamina C (VC) o Sulfato de hierro (FeSO ₄) y agua.	15

RESUMEN

El Metil MetanoSulfonato (MMS) es un agente alquilante directo monofuncional con gran afinidad a los centros nucleofílicos del ADN y genera especies reactivas de oxígeno (ROS) que dañan a este nucleico. Aunque la vitamina C (VC) presenta una reacción reversible de óxido-reducción, en el ciclo redox se producen los radicales libres ascorbil, por lo que si hay un exceso de VC, y especialmente en presencia de $\text{Fe}^{2+/3+}$, se espera mayor daño al ADN. En este trabajo se evaluó el efecto *in vivo* del MMS (0.5 mM), el sulfato ferroso (FeSO_4) (0.2 mM), la VC (5.6 mM) y sus interacciones con la prueba de mutación y recombinación somáticas (SMART) en ala de *Drosophila melanogaster*. Por lo anterior, se alimentaron con estos compuestos + Medio Instantáneo Carolina (DIM) a larvas de 72 ± 4 h de edad, de las cruzas estándar (E) y bioactivación elevada (BE) por 48 h. Se propone que la disminución del daño en la cruz BE, tratada con MMS, se deba a los niveles constitutivos altos de citocromos p450 que aumentan las ROS; esto debe inducir la reparación del daño y la apoptosis. Esta modulación del daño explicaría la ausencia de daño genotóxico en los testigos VC, FeSO_4 y VC+ FeSO_4 de la cruz BE y la disminución del daño provocado por el MMS en los cotratamientos y en ambas cruzas.

1. INTRODUCCIÓN

Actualmente existe un gran número de compuestos que constituyen un riesgo para la salud, debido a que se les han atribuido ciertas propiedades mutagénicas, genotóxicas y cancerígenas (Shils y cols., 2002).

Se sabe que muchos compuestos al ser consumidos por los organismos, pueden ocasionar daño genotóxico debido a que son activados por las enzimas del metabolismo xenobiótico (Lee, 1995). Para sobreponerse a estas condiciones, las células disponen de diversos mecanismos de "aviso" o de "emergencia" que detectan la aparición de distintas alteraciones que pueden afectar su funcionalidad e integridad y se encargan de reparar situaciones como los daños y perturbaciones en el genoma, en el crecimiento, división celular y otros (Liras, 2004), y en los casos extremos se induce la apoptosis (Niida y Nakanishi, 2005) que es el suicidio programado que elimina células dañadas (Opferman, 2003).

El daño o alteración en el genoma se traduce en cambios que pueden constituir, en algunos casos, un hecho irrelevante para la vida pero que, en otros muchos, puede representar la aparición de anomalías (Liras, 2004).

1.1 Metil MetanoSulfonato (MMS)

Los agentes metilantes electrofílicos son capaces de reaccionar con sitios nucleofílicos sobre el ácido desoxirribonucleico (ADN). El MMS (Figura 1) modifica el ADN añadiendo grupos metilo (CH_3^+) a sitios nucleofílicos en sus bases (Wyatt y Pittman, 2006).

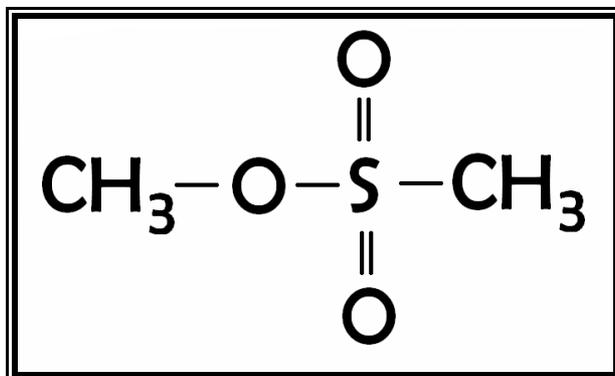


Fig. 1 Metil MetanoSulfonato.

Este agente alquilante directo monofuncional (Vogel y cols., 1990) tiene dos grupos metilos pero sólo dona un metilo a los oxígenos (O) o nitrógenos (N) de las bases (preferentemente al N7 de la Guanina y N3 de la Adenina), excepto al N 1 de las pirimidinas y el N 9 de las purinas que se unen a la d-ribose (Jenkins y cols., 2005). Este agente es directo porque no necesita ser metabolizado para que se unan los alquilos al ADN (Friedberg y cols., 1995) y produce efectos clastogénicos (Wyatt y Pittman, 2006; Vogel y cols., 1990). Además es utilizado como solvente, insecticida y agente quimioterapéutico con una alta selectividad nucleofílica (Jenkins y cols., 2005).

La mayoría de los agentes alquilantes directos tienen citotoxicidad y propiedades mutagénicas (Figura 2) (Wyatt y Pittman, 2006; Jenkins y cols., 2005). Estos son capaces de inducir una variedad de lesiones (Elder y cols., 1998) incluyendo los aductos del ADN, enlaces cruzados (*cross-links*) y la ruptura de las cadenas (*strand breaks*), los cuales pueden ser expresados como aberraciones cromosómicas; el MMS genera sólo rupturas, de bandas sencillas (*SSBs*) y dobles (*DSBs*) (Jenkins y cols., 2005; Fatur y cols., 2003).

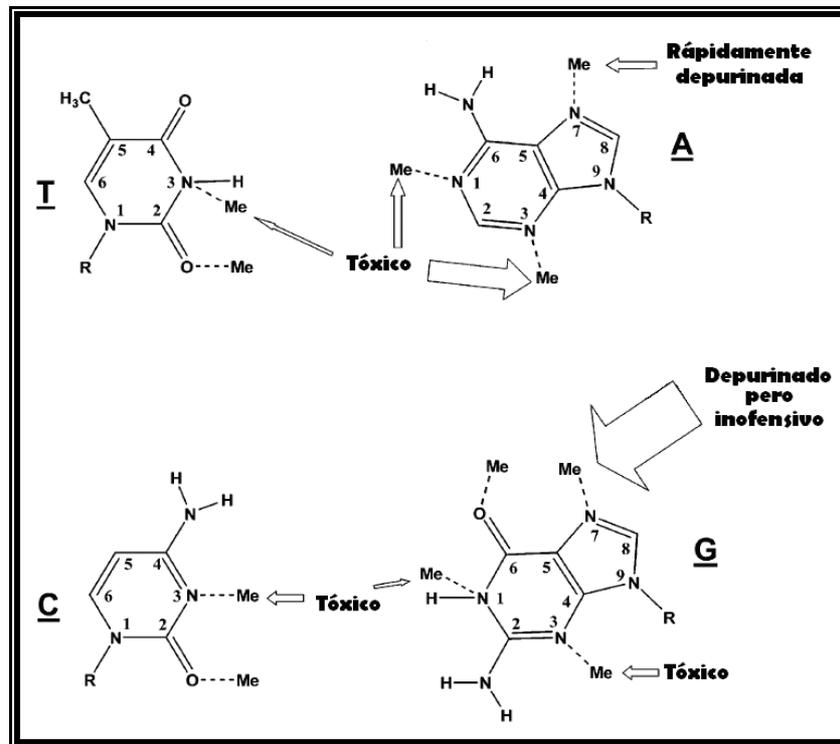


Fig. 2 Sitios de metilación en las bases del ADN por MMS. Las flechas indican los sitios de los aductos provocados por el metilo y el tamaño de las flechas representan la proporción relativa de los aductos (Modificado de Wyatt y Pittman, 2006).

El ADN dañado por el MMS es reparado por metiltransferasas, alquiltransferasas y reparación por escisión de bases (*BER*, por sus siglas en inglés) (Figura 3) (Jenkins y cols., 2005; Fatur y cols., 2003) sin embargo, la apoptosis y los puntos de chequeo (*checkpoints*) son otros sistemas de protección (Casarett y Doull, 2001).

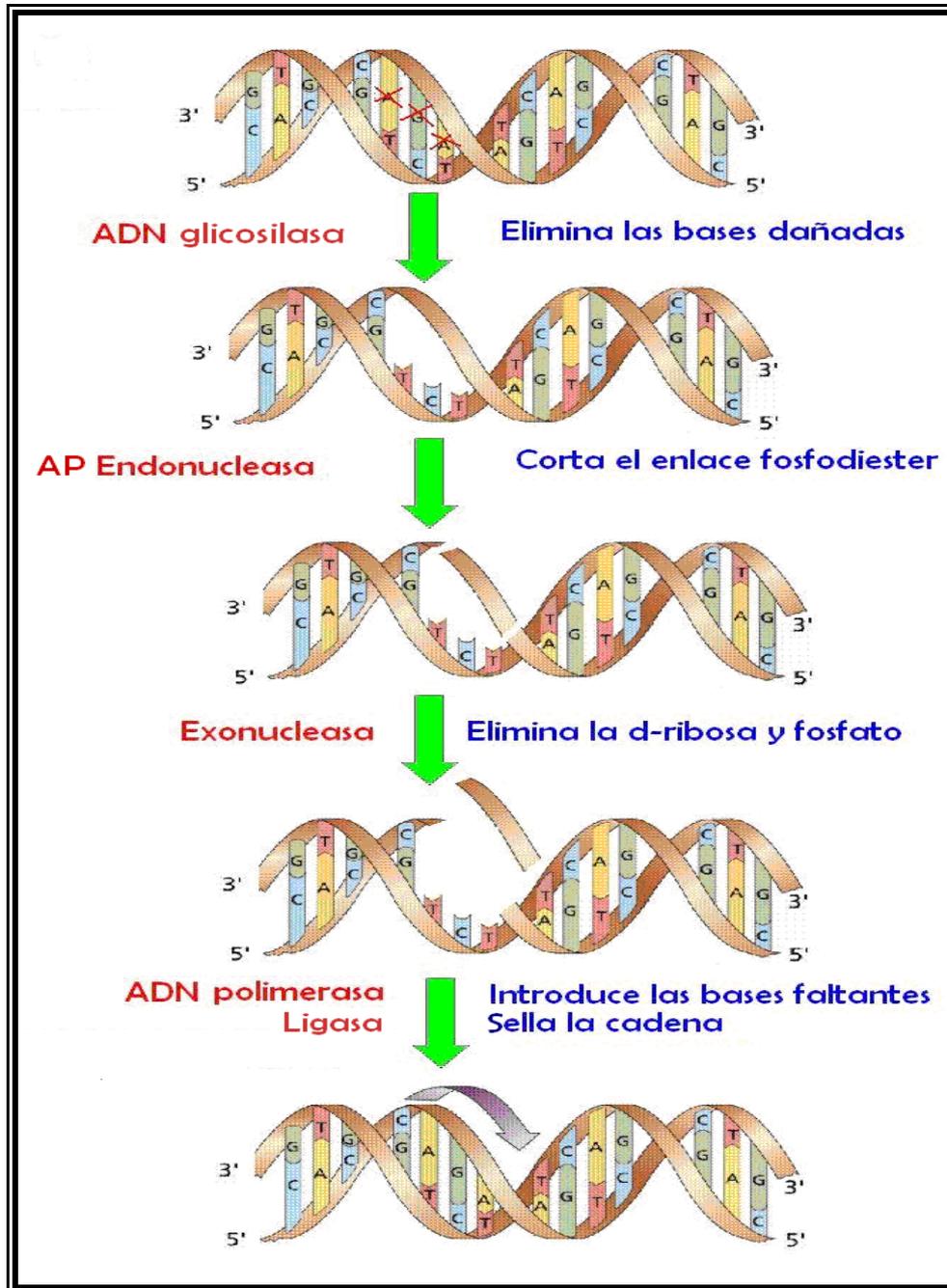


Fig. 3 Esquema general de la reparación por escisión de bases (BER). La ADN glicosilasa produce un sitio abásico, después la AP endonucleasa rompe el enlace azúcar-fosfato, la exonucleasa retira la d-ribosa y fosfatos, la ADN polimerasa agrega las bases faltantes y finalmente la ADN ligasa sella la cadena para que quede reparada (Modificado de Wyatt y Pittman, 2006; Friedberg y cols., 1995).

1.2 VITAMINA C (VC)

Aunque desde 1790 se conoce la existencia en los cítricos de un factor que previene el escorbuto, éste no fue aislado e identificado hasta 1933, cuando G. Glen King y W. A. Waugh aislaron del jugo del limón el factor antiescorbuto. La determinación de su estructura tuvo lugar después (Lehninger, 1982) y se describió como vitamina C también conocida como ácido L-ascórbico, que es una de las más importantes y esenciales vitaminas hidrosolubles en primates (Block, 2004). Se precisa en la dieta humana (Davey y cols., 2000), a diferencia de los otros vertebrados porque se carece de las rutas biosintéticas; la mayor parte de los animales, y probablemente todas las plantas, pueden sintetizar la VC a partir de la glucosa (García y cols., 2006; Toporek, 1984; Lehninger, 1982).

La VC (Figura 4) es una molécula hidrosoluble que después de consumirse se encuentra intra y extracelularmente en la mayor parte de los sistemas biológicos (Campbell y cols., 2005). El nombre químico de la VC es 2,3-didehidro-L-treohexano-1,4-lactona (Shils y cols., 2002).

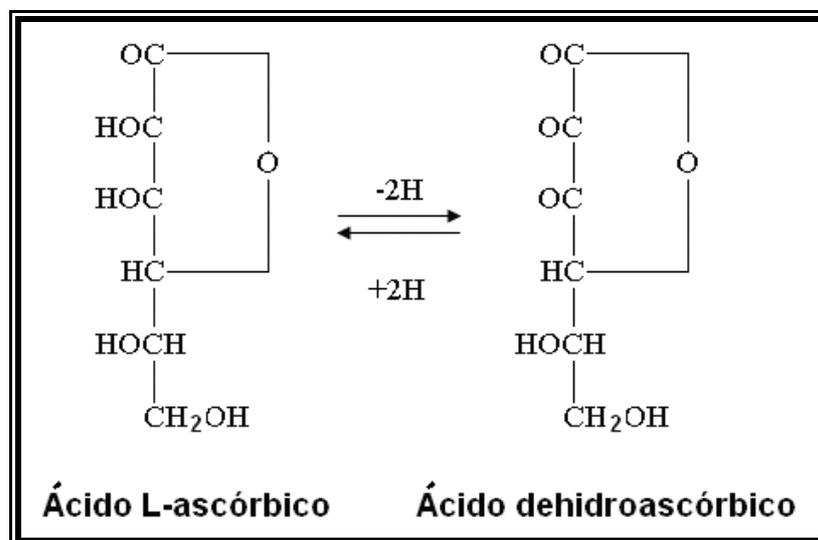


Fig. 4 Reacción reversible de óxido-reducción del Ácido L-ascórbico (Vitamina C).

Esta vitamina genera una reacción reversible de óxido-reducción que la transforma en el ácido dehidroascórbico (DHA) (Figura 4) el cual tiene muchas actividades biológicas (Campbell y cols., 2005; Block, 2004; Gil y cols., 2001) como protección antioxidante indirecta al aportar electrones para regenerar la forma reducida activa de otros antioxidantes biológicos como glutatión, tocoferol y flavonoides (Shils y cols.,

2002). La VC neutraliza el oxígeno singlete ($O_2^{1/2}$), captura radicales hidroxilos, captura aniones hiperóxidos y regenera la forma oxidada de la vitamina E (Rodríguez y cols., 2001). Sin embargo, en el intermedio del ciclo redox se producen los radicales libres ascorbil (Rosen, 1999) (Figura 5), por lo que si hay una sobrecarga de VC, éstos causarán daño al ADN de las células (Lutsenko y cols., 2002).

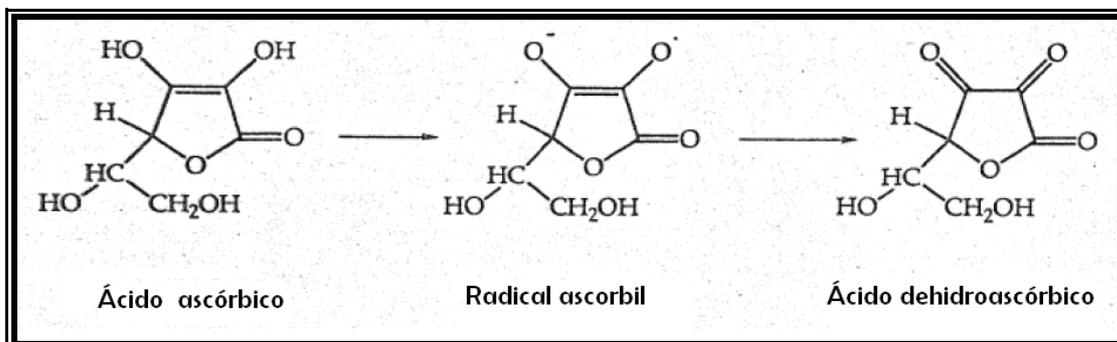


Fig. 5 El ácido ascórbico es oxidado a radical ascorbil y después transformado en ácido dehidroascórbico (Tomado de Rosen, 1999).

No obstante, el descubrimiento de sus roles prooxidantes han abierto un nuevo campo en la biología (García y cols., 2006), porque la VC puede causar daño al ADN por exceso del radical ascorbil (Lutsenko y cols., 2002); además la interacción de ésta con los metales de transición como el Cu^{2+} y el Fe^{2+} , puede contribuir al daño prooxidativo (García y cols., 2006) que depende de la dosis para que se produzca la reacción de Fenton, y éste es amplificado por la presencia adicional de ciertos radicales libres en el medio en el que se encuentre (Proteggente y cols., 2000; Kitts, 1997). Así, la célula puede entrar en apoptosis (Opferman, 2003).

1.3 $FeSO_4$ y el ión Fe

La forma de absorber el hierro es creando sales ferrosas por lo que el Sulfato de hierro (II) también conocido como sal de fierro o sulfato ferroso ($FeSO_4$), se utiliza como suplemento alimenticio, éste se disuelve rápidamente en el sistema digestivo y libera el Fe^{2+} (radical libre) que es muy importante en los procesos biológicos (James y cols., 2007; Bacon y Briton, 1990). En el interior de las células el Fe^{2+} interviene en un gran número de reacciones de relevancia biológica debido a un estado activo redox (Rosen, 1999); notablemente el $Fe^{2+/3+}$ ha sido implicado en el estrés oxidativo, debido la reacción de Fenton (Figura 6). Ha sido ampliamente demostrado que la actividad catalítica intracelular del Fe está implicada en la toxicidad de xenobióticos (Boelsterli, 2003). Entre estos compuestos se ejerce una acción tóxica, mediante la activación

metabólica a productos intermedios reactivos, que son radicales libres (Gil y cols., 2001). La actividad redox del Fe intracelular es potencialmente peligrosa, ésto se ha expuesto en experimentos en los cuales un prooxidante provoca un estrés oxidativo en presencia de Fe. Así, se ha demostrado la capacidad que tiene el $\text{Fe}^{2+/3+}$ con los agentes alquilantes para producir un exceso de radicales libres (Gil y cols., 2001).

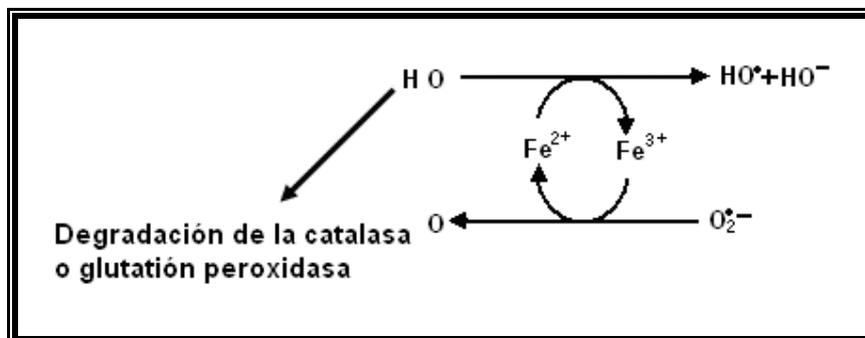


Fig.6 Reacción de Fenton (Tomado de Boelsterli, 2003).

En el interior de la célula el Fe^{3+} es rápidamente reducido a Fe^{2+} , se une a compuestos de pequeño peso molecular que constituyen el almacén de Fe libre o lábil (*LIP, labile iron pool*) de donde iones ferrosos son intercambiados con otros compartimentos, incluyendo las mitocondrias. El Fe asociado (*LIP*) es la fracción activamente catalítica que participa en la reacción de Fenton. No sólo el estrés redox, aumentado por el metabolismo xenobiótico, es la causa primaria de la formación de especies reactivas de oxígeno (*ROS*, por sus siglas en inglés), sino que los químicos y sus metabolitos con alto potencial redox negativo pueden reducir a la proteína ferritina, que tiene unido Fe^{3+} , y causar la liberación de Fe^{2+} en el citoplasma. Esto puede aumentar enormemente el tamaño de *LIP* y por lo tanto la producción de radicales hidroxilo dañinos (Boelsterli, 2003; Ballester y cols., 1996).

El Fe es el principal metal de transición que cataliza el estrés redox y la formación de radicales hidroxilo puede desencadenar el daño macro-molecular (Bonilla y cols., 2006; Boelsterli, 2003; Halliwell, 1999). De esta forma éste mecanismo incluye la generación de ROS, daño al ADN e inducción de la apoptosis (Hong, 2007).

1.4 Especies Reactivas de Oxígeno (ROS)

Las ROS como el superóxido ($O_2^{\bullet-}$), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el hidroxilo (OH^{\bullet}) y el peroxinitrito ($ONOO^-$) se están originando continuamente en los sistemas biológicos; sin embargo, cuando hay una hiperproducción, o bien cuando los sistemas de defensa antioxidante no funcionan adecuadamente, estas especies tan reactivas provocan daños celulares, de hecho son considerados los de mayor relevancia en una variedad de procesos patológicos (Juge, 2007; Halliwell and Gutteridge, 1999; 1989). Además de los sistemas intracelulares, existen orígenes exógenos de las ROS como la radiación ionizante, la radiación ultravioleta o la luz visible (Gil y cols., 2001).

La formación de radicales también está involucrada en la toxicidad de una amplia variedad de xenobióticos (Martínez-Cayuela, 1998). La mayor parte de los elementos celulares pueden ser dañados por las ROS, pero las proteínas, los ácidos grasos, los ácidos nucleicos y los hidratos de carbono resultan ser los blancos primordiales. Cuando éstas reaccionan con tales biomoléculas, la estructura de las mismas se altera y, como resultado de ello también perturba el correcto funcionamiento de la célula (Gil y cols., 2001).

Gran parte de la citotoxicidad de las ROS es la producción de aberraciones cromosómicas causadas por las modificaciones químicas que sufren las bases y los azúcares del ADN al reaccionar con esas especies (Fortini y cols., 2000; Higuchi y Linn, 1995). Esas alteraciones químicas provocan reacciones de entrecruzamiento y en muchos casos, el rompimiento de las hebras del ADN. Si el daño que se produce es tan grande que no puede ser reparado, entonces se origina una mutación, o muere la célula (Davies y cols., 1990).

1.5 SMART

La prueba de mutación y recombinación somáticas (*SMART*, por sus siglas en inglés) determina el daño en células somáticas del ojo y del ala en el modelo biológico *Drosophila melanogaster* (Vogel, 1992). El fundamento de la prueba en ala es "la pérdida de heterocigosis de genes marcadores que se expresan como clones o manchas de tricomas múltiples o mal formados, derivados de células mutantes en las alas de los organismos adultos" ocasionada por la actividad genotóxica de compuestos que inducen eventos genéticos como: mutaciones puntuales, deleciones, recombinaciones somáticas y no-disyunción (Graf y cols., 1998; 1995; 1984) (Figura 7).

La prueba SMART en ala se utiliza para determinar la actividad mutagénica provocada por agentes químicos en sistemas eucariontes *in vivo* (Spanó y cols., 2001), ha mostrado ser muy eficiente, ya que sólo requiere de una generación de *D. melanogaster*, es sensible y de muy bajo costo, con respecto a las que se realizan con roedores, lo que la hace muy pertinente, se han realizado con ella múltiples estudios sobre genotoxicidad y antigenotoxicidad de varios compuestos y mezclas (Vogel, 1999); en tratamientos crónicos (Lehman y cols., 2000; Santos y cols., 1999) y agudos con MMS (Graf y cols., 1990), además el 60% de 289 genes de enfermedades humanas son similares en *Drosophila melanogaster* (Adams y cols., 2000).

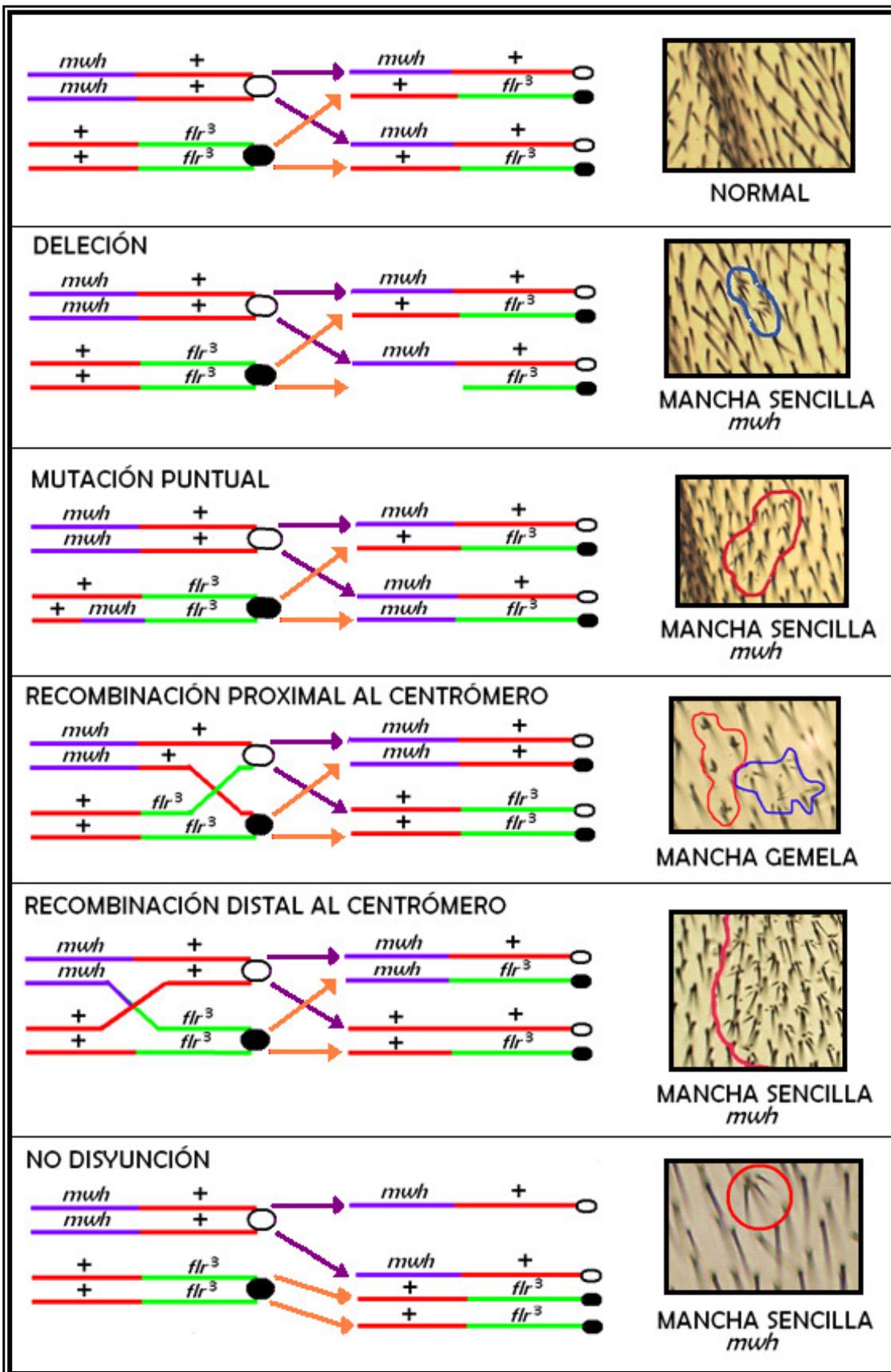


Fig. 7 Eventos genéticos que llevan a la pérdida de heterocigosis en *Drosophila melanogaster* y su expresión fenotípica (Tomada de Guzmán-Rincón, 2001. Modificada de Graf y cols., 1984).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo general:

- Evaluación del efecto genotóxico del MMS (0.5mM), el FeSO₄ (0.2 mM) y la VC (5.6 mM) con la prueba de mutación y recombinación somáticas (SMART) en ala de *Drosophila melanogaster*, en las cruas E y BE.

2.2 Objetivo particular:

- Determinar si hay interacciones entre el MMS, el FeSO₄ y la VC.

3. HIPÓTESIS

- La vitamina C (5.6 mM) aumenta el daño producido por el MMS (0.5 mM), por lo que al adicionar FeSO₄ (0.2 mM), que modula la actividad prooxidante de esta vitamina, la interacción con el MMS debe variar.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Metil Metanosulfonato (MMS), Vitamina C (VC), Sulfato ferroso (FeSO₄) y Medio Instantáneo Carolina (DIM).

El MMS (CAS 66-27-3, pureza 98%), la VC (CAS 50-81-7, pureza 99%) y el FeSO₄ (CAS 13463-43-9, pureza 99.99%), se obtuvieron de Sigma (St Luis, MO, EUA), y se disolvieron en agua desionizada.

El Medio Instantáneo Carolina (DIM) de Carolina Biological Supply Co. (Burlington, North Carolina, EUA).

4.2 Cultivo y colecta de huevos de las líneas de *Drosophila melanogaster*

Se propagaron las líneas Oregon-*flare*³, *flare*³ (*flr*⁻³) y *multiple wing hairs* (*mwh*) de *D. melanogaster* en medio de levadura activada con sacarosa, se colectaron huevos de la cruce estándar (E): (*flr*³/TM3, *Bd*^f X *mwh*|*mwh*) y de bioactivación elevada (BE): (*ORR(1);ORR(2); flr*³/TM3, *Bd*^f X *mwh*|*mwh*) (VER APÉNDICE 1).

4.3 Obtención de larvas y tratamientos

Se obtuvieron larvas de 72 ±4 h de edad (Figura 8) se retiraron del medio de levadura activada con un colador metálico de malla fina de acero inoxidable, lavando con agua corriente (25 °C). Se expusieron a los tratamientos crónicos correspondientes (CUADRO I) + DIM y diez días más tarde se extrajeron los adultos para conservarlos en alcohol al 70%.



Fig. 8 Tratamientos y obtención de larvas de 72±4h.

Cuadro I. Diseño experimental para los testigos y cotratamientos.

Factor A	Factor B	Factor C	Factores e Interacciones
MMS 0.5 mM	VC 5.6 mM	FeSO ₄ 0.2 mM	
-	-	-	Testigo agua
+	-	-	A
-	+	-	B
-	-	+	C
+	+	-	A y B
-	+	+	B y C
+	-	+	A y C
+	+	+	A, B y C

4.4 Preparaciones permanentes

Se realizaron preparaciones permanentes de las alas del fenotipo silvestre (+/+) en solución de Faure (30 g de goma arábica, 20 ml de glicerol, 50 g de hidrato cloral y 50 ml de agua). A cada preparación se le colocó una clave (Figura 9) para su posterior identificación; estas claves se cubrieron con un doble ciego para evitar una lectura con prejuicio.

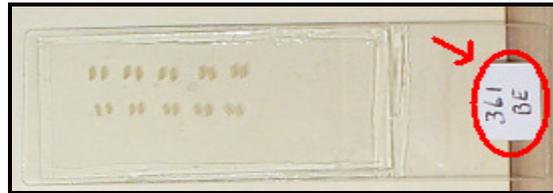


Fig. 9 Preparación permanente de las alas del fenotipo silvestre c/clave.

4.5 Registro de la frecuencia de manchas por individuo

Las preparaciones se revisaron observando las dos superficies de cada ala en el microscopio óptico a 40X; se registró en las regiones A, B, C, C', D, D' y E (Figura 10) el número y el tipo de manchas o clones presentes (*flr³* y *mwh*) para conocer la frecuencia de las manchas por individuo (pequeñas o grandes, sencillas o gemelas) (Graf, 1984).

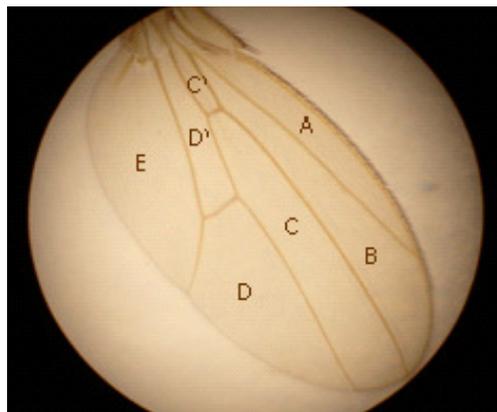


Fig. 10 Regiones del ala de *Drosophila melanogaster*.

Tomada en el microscopio óptico 10X.

4.6 Análisis estadístico

Se realizaron tres experimentos independientes con tres réplicas por concentración. Los datos se analizaron estadísticamente por medio del programa SMART para PC, V2.1, que evalúa las frecuencias de las manchas en las alas con la prueba de ji cuadrada, donde $\alpha = 0.05$, que considera las proporciones (Graf y cols., 1984). En los casos en que los resultados fueron indecisos (Frei y Würzler, 1995) se realizó el análisis con la prueba de U de Mann-Whitney y Wilcoxon (APÉNDICE 2) que es un estadístico no paramétrico que considera la variabilidad individual. En el análisis para distribución de los clones *mwh* se realizó una prueba con bondad de ajuste (ji cuadrado).

5. RESULTADOS

5.1 Frecuencia de manchas

La comparación entre los testigos VC, FeSO₄, y VC + FeSO₄ con respecto al testigo agua (Cuadro II) muestran en la cruz E resultados positivos para manchas pequeñas y totales. Por el contrario, en la cruz BE no hubo resultados positivos para todos los tipos de manchas, lo que demuestra que existen diferencias entre las cruzas para los testigos mencionados (Gráfica 1 y 2).

Al comparar los cotratamientos con el testigo MMS se obtuvieron resultados negativos para todos los tipos de manchas (Cuadro III). Para comprobar si existían diferencias estadísticas entre el MMS sólo y los cotratamientos (MMS + VC; MMS + FeSO₄; MMS + VC + FeSO₄) se analizaron los datos con SMART (PC) usando el MMS como “experimental” obteniéndose para las frecuencias y el número de clones *mwh* por individuo los siguientes resultados en ambas cruzas (Cuadro III y gráficas 1 y 2):

- (1) Hay disminución estadísticamente significativa de todos los tipos de manchas por efecto de los cotratamientos ;
- (2) Al comparar los resultados de los cotratamientos entre las cruzas no hay diferencias estadísticamente significativas, es decir, que las frecuencias en ambas cruzas son similares;
- (3) En cuanto a las manchas gemelas se observa que en la cruz E existe una disminución con respecto a los cotratamientos, lo cual no sucede con la cruz BE.

CUADRO II. Resumen de los resultados obtenidos en el ensayo de ala de *Drosophila melanogaster* (SMART), alimentadas con DIM al que se añadió agua (H₂O) Vitamina C (VC) o Sulfato de hierro (FeSO₄). El testigo MMS muestra una frecuencia mayor en todos los tipos de manchas.

Tratamiento (Concentración)	Número de moscas	Manchas por mosca (número de manchas) diagnostico estadístico*												
		Manchas pequeñas (1-2 células) m=2		Manchas grandes (> 2 células) m=5		Manchas gemelas m=5		Manchas totales m=2		Manchas de clones <i>mwh</i>				
A. Cruza Estándar (E)														
H ₂ O	60	0.47	28		0.05	3		0.00	0		0.52	31		28
FeSO ₄ 0.2 mM	60	0.72	43	+	0.10	6	-	0.00	0	-	0.82	49	+	49
VC 5.6 mM	58	0.74	43	+	0.03	2	-	0.00	0	-	0.78	45	+	45
VC 5.6 mM + FeSO ₄ 0.2 mM	59	0.80	47	+	0.07	4	-	0.00	0	-	0.86	51	+	51
MMS 0.5 mM	55	34.40	1892	+	34.56	1901	+	1.82	100	+	70.78	3893	+	3870
B. Cruza Bioactivación Elevada (BE)														
H ₂ O	60	0.72	43		0.17	10		0.00	0		0.88	53		53
FeSO ₄ 0.2 mM	60	0.62	37	-	0.13	8	-	0.00	0	-	0.75	45	-	45
VC 5.6 mM	59	0.47	28	-	0.15	9	-	0.00	0	-	0.63	37	-	37
VC 5.6 mM + FeSO ₄ 0.2 mM	60	0.52	31	-	0.18	11	-	0.00	0	-	0.70	42	-	42
MMS 0.5 mM	11	15.55	171	+	30.09	331	+	0.00	0	-	45.64	502	+	502

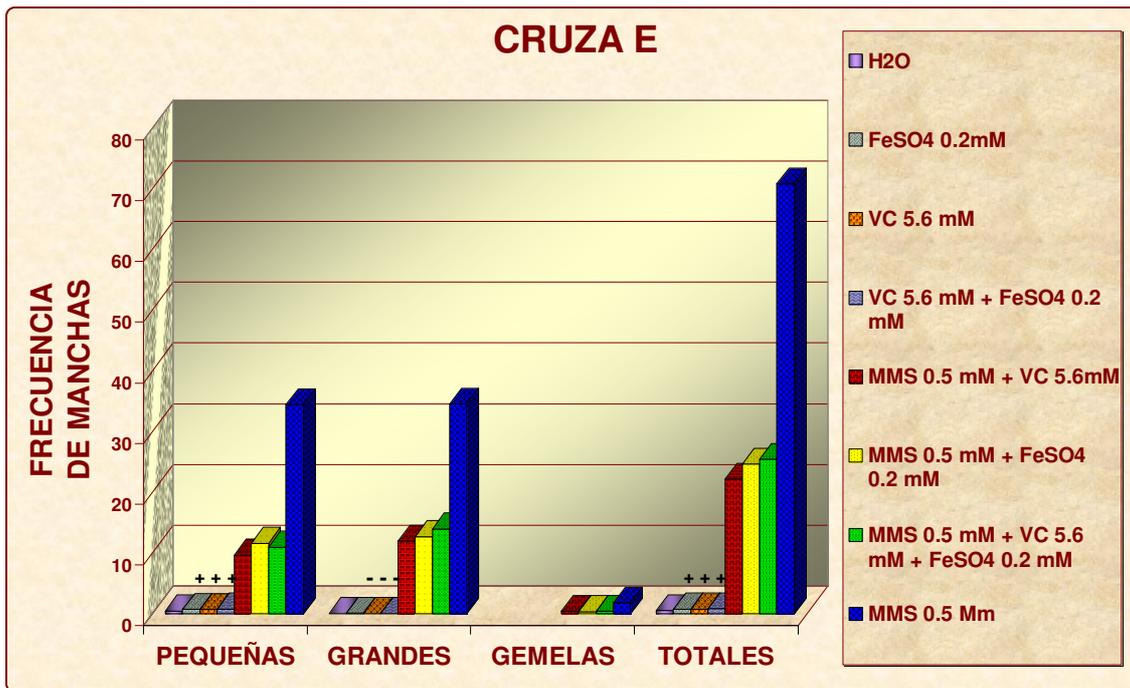
* Diagnóstico estadístico de acuerdo a Frei y Würzler (1988, 1995) en comparación con el control correspondiente (P<0.05) vs agua: -, negativo; +, positivo; m, factor de multiplicación mínimo de riesgo para la decisión estadística de resultados negativos.

CUADRO III. Resumen de los resultados obtenidos en el ensayo de ala de *Drosophila melanogaster* (SMART), alimentadas con DIM al que se añadió Metil MetanoSulfonato (MMS), Vitamina C (VC) o Sulfato de hierro (FeSO₄) y agua.

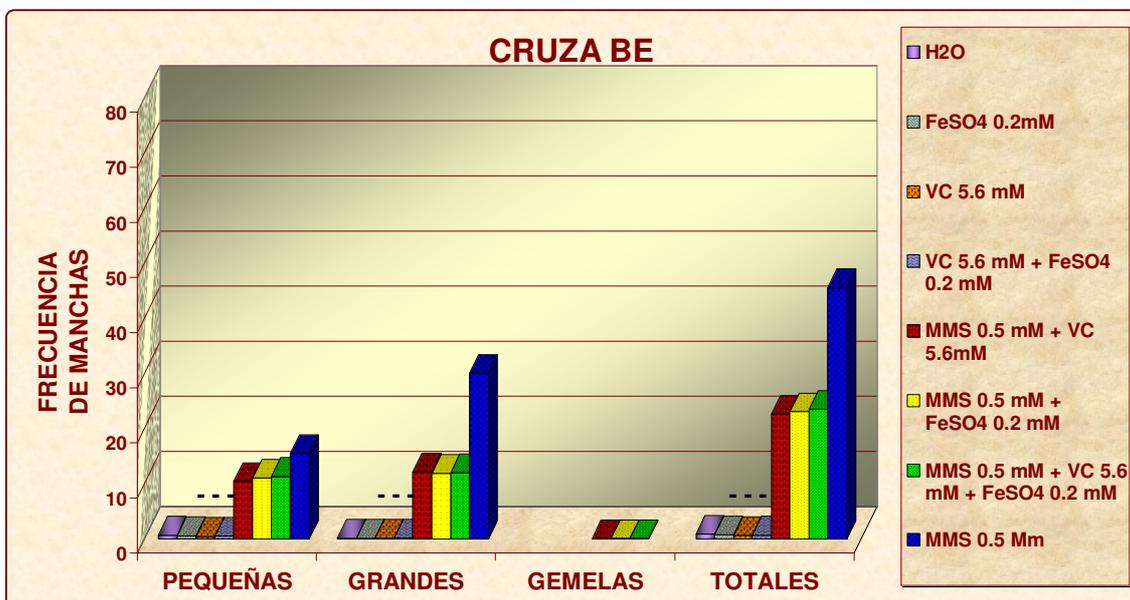
Tratamiento (Concentración)	Número de moscas	Manchas por mosca (número de manchas) diagnostico estadístico*									
		Manchas Pequeñas (1-2 células) m=2		Manchas Grandes (> 2 células) m=5		Manchas gemelas m=5		Manchas totales m=2		Manchas de clones <i>mwh</i>	
A. Cruza Estándar (E)											
MMS 0.5mM	55	34.40	1892	34.56	1901	1.82	100	70.78	3893	3870	
MMS 0.5 mM + FeSO ₄ 0.2 mM	56	11.61	650 -	12.70	711 -	0.37	21 -	24.68	1382 -	1378	
MMS 0.5 mM + VC 5.6 mM	58	9.72	564 -	12.02	697 -	0.43	25 -	22.17	1286 -	1281	
MMS 0.5 mM + VC 5.6 mM + FeSO ₄ 0.2 mM	60	10.98	659 -	13.97	838 -	0.45	27 -	25.40	1524 -	1520	
H ₂ O	60	0.47	28 -	0.05	3 -	0.00	0 -	0.52	31 -	28	
B. Cruza Bioactivación Elevada (BE)											
MMS 0.5mM	11	15.55	171	30.09	331	0.00	0	45.64	502	502	
MMS 0.5 mM + FeSO ₄ 0.2 mM	60	11.10	666 -	11.93	716 -	0.07	4 -	23.10	1386 -	1385	
MMS 0.5 mM + VC 5.6 mM	59	10.44	616 -	12.17	718 -	0.03	2 -	22.64	1336 -	1335	
MMS 0.5 mM + VC 5.6 mM + FeSO ₄ 0.2 mM	60	11.40	684 -	12.07	724 -	0.08	5 -	23.55	1413 -	1412	
H ₂ O	60	0.72	43 -	0.17	10 -	0.00	0 -	0.88	53 -	53	

* Diagnóstico estadístico de acuerdo a Frei y Würigler (1988, 1995) en comparación con el control correspondiente (P<0.05) vs MMS: -, negativo;

+



Gráfica 1. Frecuencia de manchas pequeñas, grandes, gemelas y totales de los testigos y cotratamientos para la cruz E. En los testigos FeSO_4 , VC y VC + FeSO_4 hay un aumento en las manchas pequeñas con respecto al testigo agua. En los cotratamientos se observa una disminución que es estadísticamente significativa en la frecuencia de todos los tipos de manchas con respecto al testigo MMS.



Gráfica 2. Frecuencia de manchas pequeñas, grandes, gemelas y totales de los testigos y cotratamientos para la cruz BE. En los cotratamientos se observa una disminución que es estadísticamente significativa en la frecuencia de las manchas pequeñas y grandes con respecto al testigo MMS.

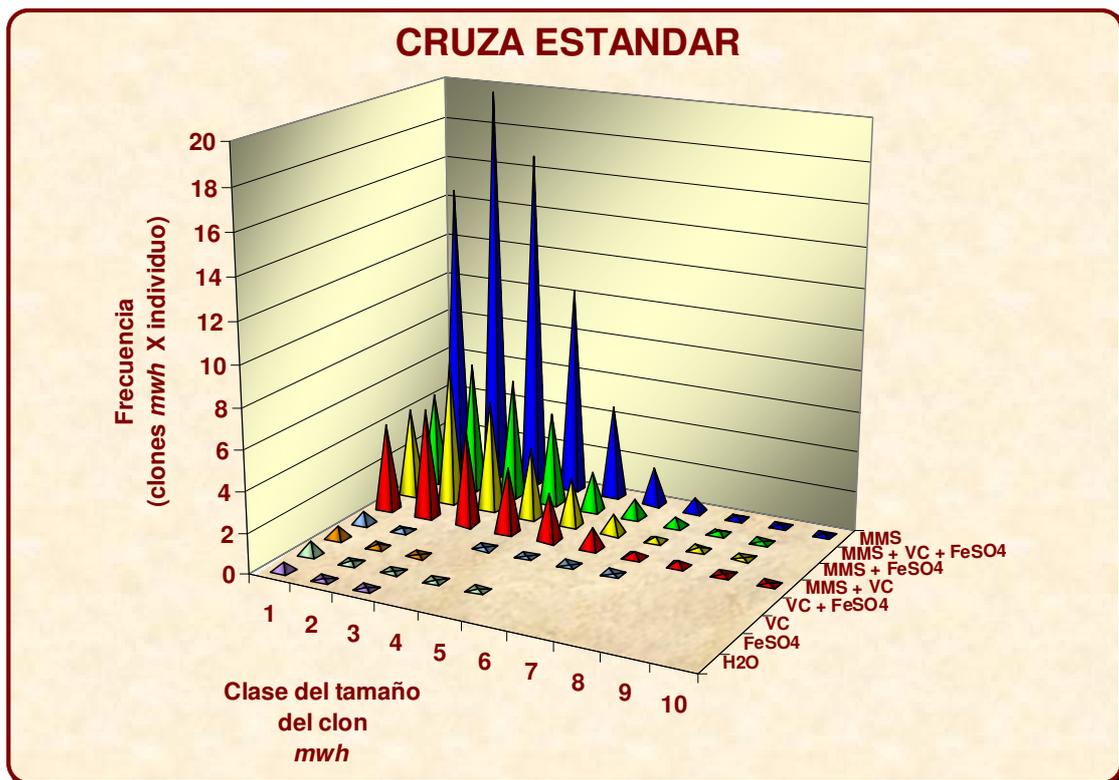
5.2 Tamaño del clon *mwh*

5.2.1 Testigos negativos

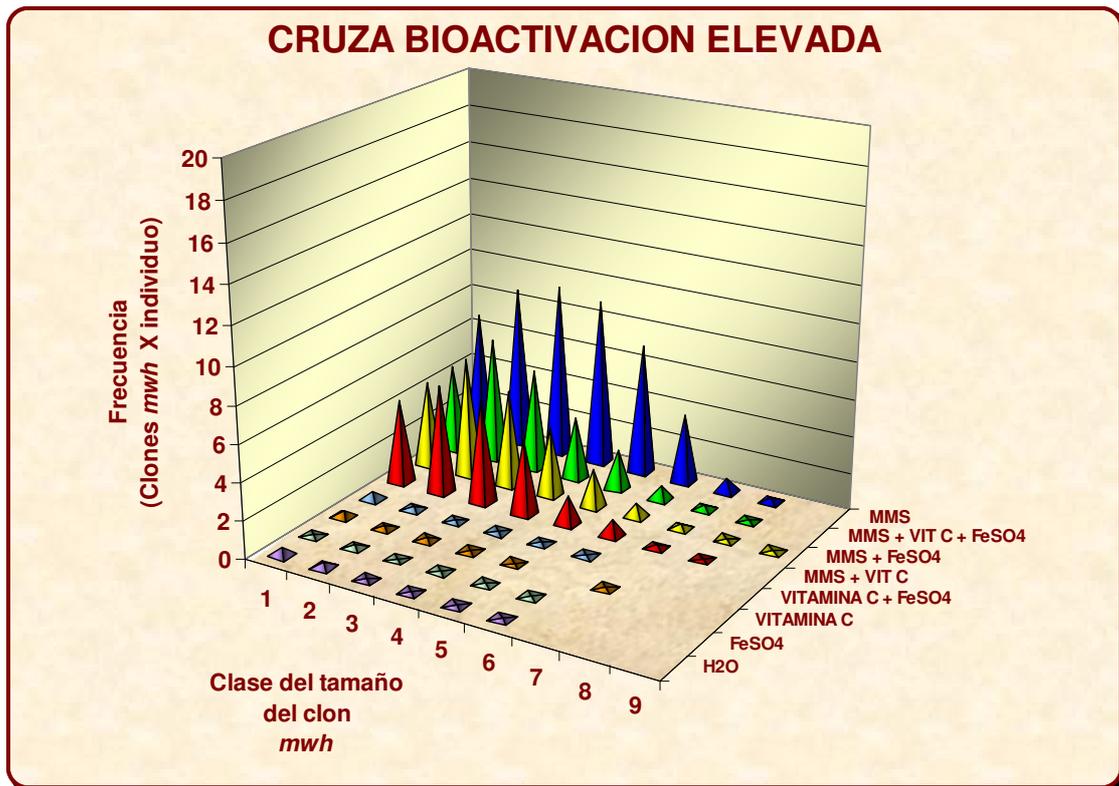
Los testigos FeSO₄, VC, y VC + FeSO₄ presentaron una distribución de clones *mwh* semejante a la del testigo agua (Gráficas 3 y 4).

5.2.2. MMS y cotratamientos

En ambas cruzas con el tratamiento MMS la distribución de clones *mwh* corresponde a lo esperado con un agente directo (Rodríguez-Arnaiz y cols., 1996) aun cuando en la craza BE hay una frecuencia menor. La prueba de ji cuadrado demostró en ambas cruzas, que los cotratamientos modificaron la distribución de los clones (Gráficas 3 y 4).



Gráfica 3. Distribución de tamaños de clones *mwh* por individuo de la craza E. Los tamaños [1 (1), 2 (2), 3 (3-4), 4 (5-8), 5 (9-16), 6 (17-32) 7 (33-64) 8 (65-128) 9 (129-256) 10 (+ de 256)] representan el número de divisiones que ocurrieron en las células somáticas mutantes del disco imagal del ala.



Gráfica 4. Distribución de tamaños de clones *mwh* por individuo de la craza BE. Los tamaños [1 (1), 2 (2), 3 (3-4), 4 (5-8), 5 (9-16), 6 (17-32) 7 (33-64) 8 (65-128) 9 (129-256) 10 (+ de 256)] representan el número de divisiones que ocurrieron en las células somáticas mutantes del disco imagal del ala.

6. DISCUSIÓN

6.1. Testigos

El testigo agua presenta valores que coinciden con la tasa de mutación espontánea para los marcadores *mwh* y *flr*³ (Kaya y cols., 2002; Graf y cols., 1990; Graf y cols., 1989) lo que concuerda con el control histórico del laboratorio de genética toxicológica de la FES-Iztacala, por lo que se asume que no hubo factores externos que modificaran los resultados de los tratamientos. Como se esperaba, el tratamiento crónico con el MMS produjo en ambas cruza un aumento significativo en la genotoxicidad (Cuadros II y III). Estos resultados se deben a que el MMS es un agente alquilante que daña directamente al ADN (Wyatt y Pittman, 2006; Jenkins y cols., 2005; Franke y cols., 2005; El-Hamms y cols., 2003; Kaya, 2003; Rodríguez-Arnaiz y cols., 1996; Friedberg y cols., 1995; Fiorio y cols., 1994).

Contrariamente a lo esperado (Jenkins y cols., 2005), con el testigo MMS hubo diferencias estadísticamente significativas entre las cruzas (datos no mostrados) porque en la cruz E hubo un incremento en las manchas pequeñas y grandes. A la fecha no existen en la literatura científica reportes sobre tratamientos crónicos en la cruz BE de SMART en ala, y se sugiere que esta diferencia podría deberse a que en BE los citocromos son constitutivos y posiblemente contiendan con el daño producido por los intermediarios que participan en ROS (Horváthova, 1998).

Con los testigos VC, FeSO₄ y VC + FeSO₄ hay diferencias entre las cruzas, ya que sólo fueron positivos en la cruz E al compararlos con el agua. Para explicar esto hay que considerar que la diferencia entre ellas está dada por la síntesis basal de los CYPs en la cruz E y constitutiva en la cruz BE. Se ha demostrado la intervención de los CYPs que aumentan los procesos de estrés oxidativo (Nagata y cols., 2007; Wiseman, 2006; Plant, 2003; Santiago y cols., 2002) lo cual implicaría que los ROS que se producen perturbarían el ciclo celular (Santiago y cols., 2002; Shackelford y cols., 1999).

6.2. Cotratamientos

La disminución estadísticamente significativa en la frecuencia de manchas en los cotratamientos con respecto al testigo MMS y en ambas cruzas, implica una interacción que podría ser explicada por la actividad prooxidante ya descrita que aumentara el daño genotóxico provocado por el MMS e incrementara el sistema de reparación por BER (Wyatt y Pittman, 2006; Jenkins y cols., 2005); al no repararse eficientemente el daño las células entrarían a apoptosis (Shackelford y cols., 1999). Debido a que entre el testigo MMS y los cotratamientos (Gráficas 3 y 4) hay diferencias estadísticamente significativas en la distribución de los clones *mwh* se demuestra que los cotratamientos afectaron el número de divisiones de las células imágales del ala, lo cual refuerza esta hipótesis.

Ya que con los cotratamientos hubo disminución significativa de la frecuencia de manchas, en ambas cruzas, con respecto al testigo MMS, se debe considerar la actividad molecular que cada compuesto tiene dentro de las células. Se ha reportado que la VC, en diferentes modelos (Franke y cols., 2005; Konopacka y cols., 1998; Green y cols., 1994) a diferentes concentraciones y periodos de tratamiento tiene actividad anti o prooxidante. Green y cols. (1994) midieron los rompimientos del ADN inducidos

por la radiación ionizante en linfocitos humanos (*in Vitro*) y reportaron que una dosis alta (200 μ M) de VC no ofrece ninguna protección, por lo contrario, induce el rompimiento del ADN; en contraste Kaya (2003) demostró en la cruce E de SMART en ala de *D. melanogaster*, la disminución de la frecuencia de manchas por tratamiento con VC (17 mM) y el mutágeno MMS (0.1 mM) con 40 individuos/tratamiento, lo que coincide con los resultados de este trabajo. Sin embargo, para el testigo VC, Kaya obtuvo resultados negativos, y en este trabajo fueron positivos, lo cual podría deberse a que se utilizó una concentración mayor de MMS (0.5 mM) y una menor de VC (5.6 mM). Contradiendo a Kaya (2003), y coincidiendo con nuestros resultados, Bonilla y cols. (2006) reportaron que la VC (0.43 mM) en *D. melanogaster* actúa como prooxidante, ya que bajo algunas condiciones ésta causa la oxidación de macromoléculas y produce daños. Además, la VC actúa como co-mutágeno ya que puede promover la generación de intercambios de la cromátide hermana por interacción con los ROS (Kaya y cols., 2002; Weitberg, 1987), así como de otros tipos de daños genéticos (Vogel y cols., 1999; Konopacka y cols., 1998). Lo anterior se apoya en los hechos ya descritos acerca de que la VC, por medio de su actividad prooxidante, genera ROS (García y cols., 2006; Kaya y cols., 2002), que son más dañinos cuanto mayor sea su reactividad química, concentración y la duración de su acción (Ballester y cols., 1996). Además, la VC induce la descomposición de hidroperóxidos lipídicos (Boesterli, 2002) independientemente de las interacciones con metales (Lutsenko y cols., 2002). Los resultados de este trabajo podrían ser explicados por cualquiera de las dos acciones reportadas para la VC, pero el hecho de que la VC fue positiva con respecto al testigo agua, sugiere un efecto prooxidante que podría haber aumentado el daño a niveles que llevaran a la apoptosis (Shackelford y cols., 1999).

Aunque se propone que la VC tiene efectos prooxidantes que aumentan con la presencia de metales de transición (Lutsenko y cols., 2002), Rehman y cols. (1998) obtuvieron resultados controversiales con voluntarios sanos sometidos a cosuplementos con hierro (17 mg/día de sulfato de hierro) y vitamina C (60mg/ día ó 260 mg/día de VC). El daño oxidativo en linfocitos aumentó cuando se utilizaron ambos productos, sin embargo, recuperó sus niveles normales cuando se continuó con la suplementación, lo que indica un efecto de homeostasis y falta de evidencia sobre el efecto prooxidante por la VC y el hierro. Esto concuerda con Proteggente y cols.

(2000) quienes reportaron un aumento transitorio en el total del daño oxidativo del ADN, y sugieren que a corto plazo el efecto sí es prooxidante y que la disminución del daño se deba a los sistemas de reparación. Halliwell (1999) ha reportado que a altas dosis la VC induce daños al ADN y actúa como prooxidante; este autor menciona que por mucho tiempo se han empleado mezclas de hierro y de ascorbato (radical de la VC) para estimular la oxidación (radicales libres) de macromoléculas como lípidos, ADN y proteínas, pero esto solo es posible *in vitro*, y además se produce un incremento en la reparación del ADN.

Los resultados de este trabajo sugieren que el efecto prooxidante ocurre *in vivo*. Esto coincide con Giulivi y Cadenas (1993) quienes afirman que las ROS formadas durante las interacciones de la VC, con diferentes estados redox, en presencia del grupo hemo-hierro de la mioglobina pueden no ser oxidantes débiles, cuando está presente el radical ascorbil y que éste puede propagar las reacciones oxidativas. También Konopacka y cols. (1998) estudiaron el efecto de la vitamina C, la E y los beta-carotenos sobre la actividad clastogénica de los rayos gama en células de ratones; los pre-tratamientos con altas dosis de Vitamina C (400 mg/Kg/día) aumentaron significativamente el efecto de la radiación sobre las células, ya que altas concentraciones de VC pueden potencializar la producción de radicales hidroxilo a partir de peróxido de hidrógeno, por la reacción Fenton, y con el efecto de la radiación se aumenta el daño a las células. Lo que sería posible porque Franke y cols.

(2005) probaron el efecto de dos dosis de vitamina C (1 y 30 mg/ Kg de peso corporal de ratón) más FeSO₄ sobre la genotoxicidad del MMS, en linfocitos de ratas *in vivo*, y observaron el papel modulador de la vitamina C, ya que los daños causados por el MMS en el ADN con la dosis baja de vitamina C disminuyeron; sin embargo en la dosis alta aumentó el daño genotóxico porque la vitamina C induce a los mecanismos de reparación que llegan a no ser eficientes.

Para explicar los resultados se considera lo siguiente:

- (1) el MMS produce rompimientos simples (SSBs) y dobles (DSBs) de bandas que si son mal reparados generan mutaciones (Wyatt y Pittman, 2006; Jenkins y cols., 2005);
- (2) el FeSO₄, participa en la actividad redox de los metales de transición (Fe^{2+/3+}), implicados en la reacción Fenton (Boelsterli, 2003);

(3) la VC en concentraciones altas es prooxidante y tiene efecto modulador sobre el daño genotóxico (Bonilla y cols., 2006; García y cols., 2006; Franke y cols., 2005; Kaya y cols., 2002; Lutsenko y cols., 2002; Halliwell, 1999; Konopacka y cols., 1998; Ballester y cols., 1996; Giulivi y Cadenas, 1993).

Por lo anterior, la hipótesis de que con la VC, el FeSO_4 ó VC + FeSO_4 se produjo un daño mucho mayor al que se esperaría con el MMS sólo, se fundamenta con los resultados e implicaría que no se reparó adecuadamente el daño y las células entraron en apoptosis, produciendo la disminución observada en las frecuencias de las manchas.

7. CONCLUSIONES

- ✓ Entre las cruzas tratadas con MMS sí hay diferencias estadísticamente significativas, lo cual debe estar relacionado con la generación de ROS por los CYPs, un aumento mayor de daños al ADN y los procesos de reparación y apoptosis.
- ✓ Entre las cruzas, los cotratamientos MMS con la VC, el FeSO_4 y VC + FeSO_4 no arrojaron diferencias, lo que podría relacionarse con un aumento del daño por ROS y la inducción de apoptosis.
- ✓ Las diferencias entre las cruzas, en los testigos VC, el FeSO_4 y VC + FeSO_4 , apoyan la propuesta de un aumento del daño en la craza BE que se relaciona con la disminución en la frecuencia de las manchas.

LÍNEAS Y MARCADORES

En la prueba SMART, se utilizan tres líneas, "multiple wing hair" (*mwh/ mwh*), "flare" *flr³/In (3LR)TM3, ri p^o sep bx^{34e} e^s Bd^f*; de forma abreviada: *flr³/TM3, Bd^f* y "Oregon flare" (*ORR(1);ORR(2); flr/TM3, Bd^f*) con los siguientes marcadores:

mwh (multiple wing hairs): Mutación recesiva localizada en el brazo izquierdo del cromosoma 3 (3-0.3). Su expresión fenotípica se observa como un cambio en el número de tricomas por célula (2-5) (Figura 11) (Graf y cols., 1996).

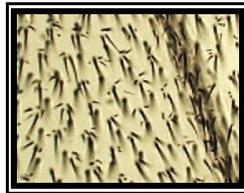


Fig. 11 Expresión fenotípica de *mwh*.

flr³ (flare): Mutación recesiva que se expresa como tricomas mal formados y cortos, con apariencia de flama o roseta de maíz. Está localizada en el brazo izquierdo del cromosoma 3 pero en una posición más próxima al centrómero que la del anterior (3-38.8). Se conocen tres alelos para este locus, todos letales en condición homocigótica. Sin embargo, las células individuales homocigotas en los discos imagales de las alas, son viables y pueden producir clones mutantes en las células del ala del adulto (Figura 12) (Graf y cols., 1998; 1996).

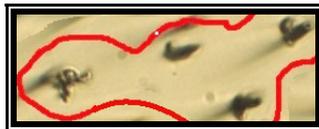


Fig. 12 Expresión fenotípica de *flr³*.

Bd^f (Beaded-Serratia): Este alelo del locus *Beaded* fue originalmente llamado *Serratia (Ser)*, se identifica porque las moscas que lo poseen presentan muescas en el borde de las alas (Figura 13). Este marcador dominante se utiliza para reconocer a las líneas *flare* y *Oregon flare*, en condición homocigótica también es letal. Se localiza en el brazo derecho del cromosoma 3 (3-92.5) (Graf y cols., 1996; 1984).



Fig. 13 *D. melanogaster* con alas aserradas.

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

OR(R) (“*Oregon resistant*”): La línea *Oregon flare* fue construida por Frölich y Wiürgler en 1989. Esta línea presenta los cromosomas 1 y 2 de la línea *Oregon R(R)* resistente al DDT. El cromosoma 2 acarrea la mutación dominante *Rst(2)DDT* localizada en la región 43E, (2-65), que provoca la expresión constitutiva de una proteína inductora de los genes *Cyp* (*Cyp6a8* y *Cyp6a9* del cromosoma 1 y *Cyp6a2* del cromosoma 2). Los genes *Cyp* se expresan en las enzimas del complejo enzimático citocromo P450. Esta mutación confiere en consecuencia, no sólo resistencia al DDT e insecticidas organofosforados en larvas y adultos, sino también el incremento general en el metabolismo xenobiótico, permitiendo valorar la activación, *in vivo*, de promutágenos (Graf y cols., 1998).

APÉNDICE 2

RESULTADOS DE LA "PRUEBA DE U"

El estadístico Ji cuadrada que se usa en el programa SMART para PC v2.1 es para dos colas (Graf y cols., 1984) y considera las proporciones esperadas con base en los resultados de los testigos negativos. Como en ocasiones dicha prueba arroja resultados no concluyentes (i) o débiles positivos (w), éstos se analizan con la prueba no paramétrica U de Mann-Whitney y Wilcoxon que considera los rangos entre los datos y la variabilidad individual (Frei y Würigler, 1995). El análisis con esta prueba (programa Statistica para PC) requiere un ajuste para estudios de genotoxicidad (de una cola) por lo que para los resultados que se obtienen con el programa referido se tiene que hacer el siguiente ajuste (Frei, comunicación personal):

Si el valor de $Z_{adjusted}$ (columna siete) es negativo, entonces el valor de $p-level$ (para dos colas) (columna ocho) deberá ser dividido entre dos.

$$pl(\text{para una sola cola}) = \frac{pl(\text{para dos colas})}{2}$$

Si el valor de $Z_{adjusted}$ (columna 7) es positivo, entonces el valor de $p-level$ (para dos colas) (columna 8) deberá ser dividido entre dos y restado de uno.

$$pl(\text{para una cola}) = 1 - \frac{pl(\text{para dos colas})}{2}$$

Estas modificaciones fueron realizadas para cada uno de los siguientes resultados de la prueba U y sirvieron para construir los cuadros II y III.

AGUA VS FESO₄ EN CRUZA E

STATISTICA - [Workbook1* - Mann-Whitney U Test (Spreadsheet1)]

Mann-Whitney U Test (Spreadsheet1)
By variable conc
Marked tests are significant at p < .05000

variable	Rank Sum AGUA	Rank Sum Fe4SO (0.2mM)	U	Z	p-level	Z adjusted	p-level	Valid N AGUA	Valid N Fe4SO (0.2mM)	2*1 sided exact p
peq	3310.500	3949.500	1480.500	-1.67694	0.093655	-1.91408	0.055611	60	60	0.093633
gdes	3541.500	3718.500	1711.500	-0.46450	0.642287	-1.14379	0.252711	60	60	0.643451
gemelas	3630.000	3630.000	1800.000	0.00000	1.000000			60	60	
totales	3253.500	4006.500	1423.500	-1.97611	0.048143	-2.20937	0.027150	60	60	0.047884

AGUA VS VC+FESO₄ EN CRUZA E

STATISTICA - [Workbook1* - Mann-Whitney U Test (Spreadsheet1)]

Mann-Whitney U Test (Spreadsheet1)
By variable conc
Marked tests are significant at p < .05000

variable	Rank Sum AGUA	Rank Sum VITC	U	Z	p-level	Z adjusted	p-level	Valid N AGUA	Valid N VITC	2*1 sided exact p
peq	3253.500	3886.500	1423.500	-1.84163	0.065531	-2.09596	0.036087	60	59	0.065394
gdes	3541.000	3599.000	1711.000	-0.31358	0.753839	-0.82723	0.408108	60	59	0.756728
gemelas	3600.000	3540.000	1770.000	0.00000	1.000000			60	59	
totales	3227.500	3912.500	1397.500	-1.97982	0.047725	-2.21744	0.026594	60	59	0.047461

AGUA VS VC EN CRUZA E

STATISTICA - [Workbook1* - Mann-Whitney U Test (Spreadsheet1)]

Mann-Whitney U Test (Spreadsheet1)
By variable conc
Marked tests are significant at p < .05000

variable	Rank Sum AGUA	Rank Sum Vit C (5.6mM)	U	Z	p-level	Z adjusted	p-level	Valid N AGUA	Valid N Vit C (5.6mM)	2*1 sided exact p
peq	3211.500	3809.500	1381.500	-1.92982	0.053630	-2.18412	0.028954	60	58	0.053405
gdes	3569.000	3452.000	1739.000	-0.00538	0.995705	-0.01717	0.986300	60	58	0.997861
gemelas	3570.000	3451.000	1740.000	0.00000	1.000000			60	58	
totales	3221.500	3799.500	1391.500	-1.87599	0.060658	-2.10134	0.035612	60	58	0.060483

FESO₄ VS AGUA EN CRUZA BE

STATISTICA - [Workbook1* - Mann-Whitney U Test (Spreadsheet1)]

Mann-Whitney U Test (Spreadsheet1)
By variable conc
Marked tests are significant at p <.05000

variable	Rank Sum Fe4SO (0.2mM)	Rank Sum AGUA	U	Z	p-level	Z adjusted	p-level	Valid N Fe4SO (0.2mM)	Valid N AGUA	2*1sided exact p
peq	3567.500	3692.500	1737.500	-0.328040	0.742882	-0.361672	0.717697	60	60	0.743783
gdes	3688.500	3571.500	1741.500	0.307045	0.758809	0.590429	0.554903	60	60	0.759662
gemelas	3630.000	3630.000	1800.000	0.000000	1.000000			60	60	
totales	3621.000	3639.000	1791.000	-0.047238	0.962324	-0.051134	0.959219	60	60	0.964549

VC+FESO₄ VS AGUA EN CRUZA BE

STATISTICA - [Workbook1* - Mann-Whitney U Test (Spreadsheet1)]

Mann-Whitney U Test (Spreadsheet1)
By variable conc
Marked tests are significant at p <.05000

variable	Rank Sum Vit C (5.6mM) + Fe4SO (0.2mM)	Rank Sum AGUA	U	Z	p-level	Z adjusted	p-level	Valid N Vit C (5.6mM) + Fe4SO (0.2mM)	Valid N AGUA	2*1sided exact p
peq	3456.000	3804.000	1626.000	-0.913263	0.361105	-1.01909	0.308159	60	60	0.363800
gdes	3777.000	3483.000	1653.000	0.771550	0.440382	1.34549	0.178469	60	60	0.443323
gemelas	3630.000	3630.000	1800.000	0.000000	1.000000			60	60	
totales	3533.000	3727.000	1703.000	-0.509118	0.610670	-0.55628	0.578019	60	60	0.613737

VC VS AGUA EN CRUZA BE

STATISTICA - [Workbook1* - Mann-Whitney U Test (Spreadsheet1)]

Mann-Whitney U Test (Spreadsheet1)
By variable conc
Marked tests are significant at p <.05000

variable	Rank Sum Vit C (5.6mM)	Rank Sum AGUA	U	Z	p-level	Z adjusted	p-level	Valid N Vit C (5.6mM)	Valid N AGUA	2*1sided exact p
peq	3276.500	3863.500	1506.500	-1.40049	0.161369	-1.58498	0.112972	59	60	0.161925
gdes	3658.000	3482.000	1652.000	0.62716	0.530553	1.12323	0.261343	59	60	0.533654
gemelas	3540.000	3600.000	1770.000	0.000000	1.000000			59	60	
totales	3365.500	3774.500	1595.500	-0.92746	0.353690	-1.01972	0.307861	59	60	0.355000

REFERENCIAS

- Adam** M. D., Celniker S. E., Holt R. A. and Evans C. A. (2000). The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science* **287**: 2185-2195.
- Bacon** B. R. and Briton R. S. (1990). The pathology of hepatic iron overload: a free radical-mediated process? *Hepatology* **11**: 127-131.
- Ballester** M. y Honores V. (1996). Antioxidantes, radicales libres y salud. Un enfoque químico-orgánico-físico. *Medica Clínica* **107**: 509-515.
- Block** G., Jensen C., Dietrich M., Norkus E. P., Hudes M. and Packer L. (2004). Plasma C-reactive protein concentrations in active and passive smokers: Influence of antioxidant supplementation. *Journal of the American College of Nutrition* **23**: 141-147.
- Boelsterli** A. (2003). Mechanistic toxicology: the molecular basis of how chemicals disrupt biological targets. Taylor Francis, London and New York. 103-106 y 135 págs.
- Bonilla** E., Medina-Leendertz S., Villalobos V., Molero L. and Bohórquez A. (2006). Paraquat-induced oxidative stress in *Drosophila melanogaster*: Effects of melatonin, glutathione, serotonin, minocycline, lipoc acid and ascorbic acid. *Neurochemistry Research* **31**: 1425-1432.
- Campbell** P., Smith A. and Peters T. (2005). Biochemistry illustrated. Biochemistry and molecular biology in the post-genomic. 5^a ed. Elsevier. 242 pp.
- Casarett** y Doull (2001). Manual de toxicología. Ed. Mcgraw Hill-Interamericana. 5^a ed. México, D.F. 981 pp.
- Davey** M. W., van Montagu M., Inze D., Sanmartin M., Kanellis A., and Sminorff N. (2000). Plant L-ascorbic acid: Chemistry, function, metabolism, bioavailability and effects of processing. *Journal of the Science of Foot and Agriculture* **80**: 825-860.
- Davies** K. J. A., Wiese A. G. and Sevanian A. (1990). Repair systems in oxidative stress. Molecular Biology of aging Finch CE Tohnson TA (eds) New York, Wiley Liss. 345 pp.
- Elder** R., Jansen J., Weeks R., Willington M., Deans B., Watson A., Mynett K., Bailey J., Cooper D., Rafferty J., Heeran M., Wijnhoven S., Zeeland A. and Margarison G. (1998). Alkipurine -DNA-N-Glicosylase Knockout mice show increased

susceptibility to induction of mutations by methyl methane sulfonate. *Molecular and Cellular Biology* **18**: 5828-5837.

El-Hamm R., Idaomar M., Alonso-Moraga A. and Muñoz A. (2003). Ant mutagenic proprieties of bell and black peppers. *Food and Chemical Toxicology* **41**:41-47.

Fatur T., Lah T. and Filipi M. (2003). Cadmium inhibits repair of UV, methyl methanesulfonate- and *N*-methyl-*N* nitrosurea-induced DNA damage in Chinese hamster ovary cells. *Mutation Research* **529**: 109-116.

Fiorio R., Velloso R. and Bronzetti G. (1994). Effects of spermine on formation of HGPRT-mutants induced by ethylmethanesulfonate, methylmethanesulfonate and mitomycin C in V79 Chinese hamster cells. *Environmental and Molecular Mutagenesis* **23**: 294-298.

Fortini P., Pascucci B., Belsario F. and Dogliotti E. (2000). DNA polymerase β are required for efficient DNA strand break repair induced by methyl methanesulfonate but not by hydrogen peroxide. *Nucleic Acids Research* **28**: 3040-3046.

Franke S. I. R., Prá D., Silva J., Erdtmann B. and Pêgas H. J. A. (2005). Possible repair action of vitamin C on DNA damage induced by methyl mathanesulfonate, cyclophosphamide, FeSO₄ and CuSO₄ in mouse blood cells in vivo. *Mutation Research* **583**: 75-84.

Frei H. and Würgler F. (1995). Optimal experimental design and simple size for the statistical evaluation of data from somatic mutation and recombination test (SMART) in *Drosophila*. *Mutation Research* **334**: 247-258.

Friedberg E. C., Walter G. C. and Siede W. (1995). DNA repair and mutagenesis. ASM Press. Washintong D.C. 698 pp.

García G. A., Cobos C., Rey C. A., Mejía O. R., Casariego C. A., Clavijo D., García A., Hernández S. y Báez S. A. (2006). Biología, patobiología y bioclínica de la actividad de óxido-reducción de la vitamina C en la especie humana. *Universitas Médica* **47**: 349-362.

Gil A., Ruiz M. D., Sastre A. y Schwartz S. (2001). Nutrición clínica: implicación del estrés oxidativo y de los alimentos funcionales. Mc Graw-Hill Interamericana. Madrid, España. 150pp.

Giulivi C. and Cadenas E. (1993). The reaction of ascorbic acid with different heme iron redox states of myoglobin. *Federation of European Biochemical Societies* **332**: 287-290.

- Graf U.** (1995). Analysis of the relationship between age of larvae at mutagen treatment and frequency and size of spots in the wing somatic mutation and recombination test of *Drosophila melanogaster*. *Experientia* **51**: 168-173.
- Graf U.**, Abraham S. K., Guzmán-Rincón J. and Würgler F. E. (1998). Antigenotoxicity studies in *Drosophila melanogaster*. *Mutation Research* **402**: 203-209.
- Graf U.**, Hall C. B. and Van Shaik N. (1990). On the use of excision repair defective cells in the wing somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Environmental and Molecular Mutagenesis* **16**: 225-237.
- Graf U.**, Spanó M. A., Rincon J. G., Abraham S. K. and De Andrade H. H. (1996). The wing somatic mutation and recombination test (SMART) in *Drosophila melanogaster*: an efficient tool for the detection of genotoxic activity of pure compounds or complex mixtures as well as for studies on antigenotoxicity. *Environmental Mutagenesis Carcinogenesis* **16**: 1-7.
- Graf U.**, Würgler F. E., Katz A. J., Frei H., Huon H., Hall C. B. and Kale P. F. (1984). Somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Environmental and Molecular Mutagenesis* **16**: 153-188.
- Green M. H. L.**, Lowe J. E., Waugh A. P. W., Aldridge K. E., Cole J. and Arleh C. F. (1994). Effect of diet and vitamin C on DNA strand breakage in freshly isolated human with blood cells. *Mutation Research* **316**: 91-102.
- Guzmán-Rincon J.**, Ramirez-Victoria P. and Benitez L. (2001). Somatic mutation and Recombination Test in *Drosophila melanogaster* used for biomonitoring of Environmental pollutants. In: Butterworth, F. M, Gonatilaka, A. and Gonsebatt, M. E. (eds.) *Biomonitoring and biomarkers as indicators of environmental change. A handbook*. Vol. 2 Klumer Academic/plenum Press publishers. E.U.A. New York. 221-237 pp.
- Halliwell B.** (1999). Vitamin C: poison, prophylactic or panacea? *Trends in biochemical Sciences* **24**: 255-259.
- Halliwell B.** and Gutteridge J. (1989). *Free radicals in Biology and medicine*. 2^{ed}. Ed. Clarendon Press Oxford. London Greayt Britain. 543 pp.
- Higuchi Y.** and Linn S. (1995). Purification of all forms of heal cell mitochondrial DNA and assessment of damage to it caused by hydrogen peroxide treatment of mitochondrial or cells. *Journal Biology Chemistry* **270**: 790-7956.
- Hong Z.**, Duncan G., Wang L., Liu P., Cui H., Reddan J., Bao-Feng Y. and Wormstone M. (2007). Arsenic trioxide initiates ER stress response, perturbs calcium signaling and

promotes apoptosis in human lens epithelial cells. *Experimental Eye Research* **20**: 1-11.

Horváthová E., Slamenova D., Hlincikova L., Mandal T. K., Gabelova A. and Collins A. (1998). The nature and origin of DNA single strand breaks determined with the comet assay. *Mutation Research* **409**: 163-171.

James H. S., LuAnn K. J. and Janet R. H. (2007). Nutrient physiology, metabolism, and nutrient interactions electrolytic iron or ferrous sulfate increase body iron in women with moderate to low iron stores. *Journal Nutrition* **137**: 620-627.

Jenkins G.J.S., Doak S.H., Johnson G.E., Quick E., Waters E.M. and Parry J.M. (2005). Do dose response thresholds exist for genotoxic alkylating agents? *Mutagenesis* **20**: 389-398.

Juge N., Mithen R. F. and Traka M. (2007). Molecular basis for chemoprevention by sulforaphane: a comprehensive review. *Cellular and Molecular Life Sciences* **64**: 1105-1127.

Kaya B. (2003). Anti-genotoxic effect of ascorbic acid on dose mutagenic of three alkylating agents. *Turk journal Biology* **27**: 241-246.

Kaya B., Creus A., Velazquez A., Yanikoglu A. and Marcos R. (2002). Genotoxicity is modulated by ascorbic acid studies using the wing spot test in *Drosophila*. *Mutation Research* **520**: 93-101.

Kaya B., Marcos R., Yanikoglu A. and Creus A. (2004). Evaluation of the genotoxicity of four herbicides in the wing spot test in *Drosophila melanogaster* using two different strains. *Mutation research* **557**: 53-62.

Kitt D. D. (1997). An evaluation of the multiple effects of the antioxidant vitamins. *Trends in Food & Science technology* **8**: 198-203.

Konopacka M., Widel M. and Rzeszowska-Wolny (1998). Modifying effect of vitamins C, E and beta-carotene against gamma-ray-induced DNA damage in mouse cells. *Mutation Research* **417**: 85-94.

Lee W. M. (1995). Drug-Induced Hepatotoxicity. *New England Journal Medicine* **333**: 1118-1127.

Lehman M., Graf U., Reguly M. L., and Rodríguez H. (2000). Interference of tannic acid on the genotoxicity of mitomycin C, methylmethanesulfonate, and nitrogen mustard in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. *Environ Molecular Mutagenesis* **36**: 195-200.

- Lehninger** Albert L. (1982). *Principios de la bioquímica*. Omega, Barcelona. Págs. 264-266.
- Liras** A. (2004) Reparación del ADN en el control de las enfermedades. *El portal de biología y ciencias de la salud* **15**: 1-5.
- Lutsenko** E. A., Cárcamo J. M. and Golde D. W. (2002). Vitamin C prevents DNA mutation induced by oxidative stress. *Biological Chemistry* **277**: 16895-16899.
- Martínez-Cayuela** M. (1998). Toxicidad de xenobióticos mediada por radicales libres de oxígeno. *Ars. Pharmaceutica* **39**: 5-18
- Nagata** K., Suzuki H. and Sakaguchi S. (2007). Common Pathogenic Mechanism in development progression of liver injury caused by non-alcoholic or alcoholic steatohepatitis. *The journal of Toxicological Sciences* **32**: 453-468.
- Niida** H. and Nakanishi (2006). DNA damage checkpoints in mammals. *Mutagenesis* **21**: 3-9.
- Opferman** J. T. and Korsmeyer S. J. (2003). Apoptosis in the development and maintenance of the immune system. *Natural Immunology* **4**: 410-415.
- Plant**, N. (2003). *Molecular toxicology*. Bios Scientific Publishers. USA. 352 pp.
- Proteggente** A. R., Rehman A., Halliwell B and Rice-Evans C. A. (2000). Potential problems of ascorbate and iron supplementation: Pro-oxidant effect in vivo? *Biochemical and Biophysical Research Communications* **277**: 535-540.
- Rehman** A., Collins C. S., Yang M., Kelly M., Diplock A. T., Halliwell B. and Rice-Evans C. (1998). The effects of iron and vitamin C co-supplementation on oxidative damage to DNA in Healthy Volunteers. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **246**: 293-298.
- Rodríguez** J. M., Méndez J. R. y Trujillo Y. (2001). Radicales libres en la biomedicina y estrés oxidativo. *Revista Cubana Médica Militar* **30**: 36-44.
- Rodríguez-Arnáiz** R., Soto P. O., Gaytán-Oyarzún J. C and Graf U. (1996). Analysis of mitotic recombination induced by several mono and bifunctional alkylating agents in the *Drosophila* wing-spot test. *Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* **351**: 133-145.
- Rosen** G., Britigan B., Halpern H. and Pou S. (1999). Free radicals. Biology and detection by spin trapping. Ed Oxford University Press, E.U.A. 482 pp.

- Santiago** C., Bandrés F., y Gómez F. (2002). Polimorfismos de citocromo P450: papel como marcador biológico. *Medicina del trabajo. Universidad Complutense de Madrid* **11**: 130-140.
- Santos** J., Graf U., Reguly M. L., and Rodríguez H. (1999). The synergistic effects of valin on recombination predominate over its antimutagenic action in relation to MMC-induced lesions in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. *Mutation Research* **444**: 355-365.
- Shackelford** R. E., Kaufmann W. K., Paules R. S. (1999). Cell Cycle Control, Checkpoint Mechanisms, and Genotoxic Stress. *Environmental Health Perspectives Supplements* 107(S1), February. Accesible en: <http://www.ehponline.org/members/1999/Suppl-1/5-24shackelford/shackelford-full.html>
- Shils** M. E., Olson J. A., Shike M. y Ross A. C. (2002). Nutrición en salud y enfermedad. Mc Graw-Hill e Interamericana, 9ª ed. Vol. 1. México. 541-572 págs.
- Spanó** M. A., Frei H., Würgler F. E. and Graf U. (2001). Recombinogenic activity of four compounds in the standard and high bioactivation crosses of *Drosophila melanogaster* in the wing spot test. *Mutagenesis* **16**: 385-394.
- Toporek** M. (1984). Bioquímica 3ª ed. Interamericana. México D.F. pp. 435-436.
- Vogel** E.W. (1992). Tests for recombinogens in somatic cell of *Drosophila*. *Mutation Research* **284**: 159-175.
- Vogel** E. W., Barbin A., Nivard M. J. M., and Bartsch H. (1900). Nucleophilic selectivity of alkylating agents and their hypermutability in *Drosophila* as predictors of carcinogenic potency in rodents. *Carcinogenesis* **11**: 2211-2217
- Vogel** E. W., Graf U., Frei, H. J. and Nivard M. M. J. (1999). The results of assays in *Drosophila melanogaster* indicators of exposure to carcinogens. *IARC Scientific Publics* **146**: 427-470.
- Weitberg** A. B. (1987). Antioxidants inhibit the effect of vitamin C on oxygen radical-induced sister-chromatid exchanges. *Mutation research* **191**: 53-56
- Wiseman** A. (2006) Oxygen-induced reperfusion-injury is caused by ROS: Amelioration is possible by recombinant-DNA antioxidant enzymes and mimics in selected tissues. *Medline Hypotheses* **66**: 329-331.
- Wyatt** M.D. and Pittman D.L. (2006). Methylating agents and DNA repair responses: Methylated bases and sources of strand breaks. *Chemistry Research Toxicology* **19**: 1580-1594.