



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

---

---

FACULTAD DE CIENCIAS

**Determinación de la actividad protectora  
del vitamínico Biometrix A-OX en  
*Drosophila melanogaster*.**

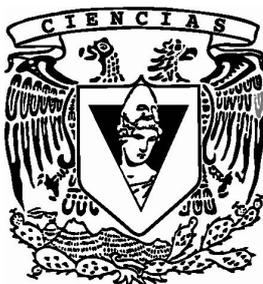
T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I O L O G A

P R E S E N T A:

YANELI TRUJILLO VARELA



DIRECTORA DE TESIS:  
DOCTORA PATRICIA RAMOS MORALES

2009



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

ACT. MAURICIO AGUILAR GONZÁLEZ  
Jefe de la División de Estudios Profesionales  
Facultad de Ciencias  
**P r e s e n t e**

FACULTAD DE CIENCIAS  
Secretaría General  
División de Estudios Profesionales

Votos Aprobatorios

Por este medio hacemos de su conocimiento que hemos revisado el trabajo escrito titulado:

**Determinación de la actividad protectora del vitamínico Biometrix A-OX en Drosophila melanogaster**

realizado por **Trujillo Varela Yaneli** con número de cuenta **3-0027270-9** quien ha decidido titularse mediante la opción de **tesis** en la licenciatura en **Biología**. Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Propietario Dra. Helia Reyna Osuna Fernández

Propietario M. en C. Alfonso José Vilchis Peluyera

Propietario Dra. Patricia Ramos Morales

Tutora

Suplente Dra. Ana María Sosa Reyes

Suplente M. en C. José Armando Muñoz Moya

Atentamente,

“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU ”

Ciudad Universitaria, D. F., a 13 de mayo de 2009

EL COORDINADOR DEL COMITÉ ACADÉMICO DE LA LICENCIATURA EN BIOLOGÍA

  
DR. PEDRO GARCÍA BARRERA

FACULTAD DE CIENCIAS



UNIDAD DE ENSEÑANZA  
DE BIOLOGÍA

Señor sinodal: antes de firmar este documento, solicite al estudiante que le muestre la versión digital de su trabajo y verifique que la misma incluya todas las observaciones y correcciones que usted hizo sobre el mismo

\*czs

1. Datos del alumno

Trujillo

Varela

Yaneli

22081711

Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Ciencias

Biología

300272709

2. Datos del tutor

Dra.

Patricia

Ramos

Morales

3. Datos del sinodal 1

Dra.

Helia Reyna

Osuna

Fernández

4. Datos del sinodal 2

M en C

Alfonso José

Vilchis

Peluyera

5. Datos del sinodal 3

Dra.

Ana María

Sosa

Reyes

6. Datos del sinodal 4

M en C

José Armando

Muñoz

Moya

7. Datos del trabajo escrito

Determinación de la actividad protectora del vitamínico Biometrix A-OX en *Drosophila melanogaster*.

60 p

2009

## **DEDICATORIA**

### ***A mis padres:***

*Herminio Trujillo Arce  
Herminia Varela Ríos*

*Gracias por todo el apoyo, amor y comprensión que me han brindado durante toda mi vida, en esos momentos difíciles y felices que hemos pasado juntos. Este logro también es suyo, los amo.*

### ***A mi hermano:***

*Omar Trujillo Varela*

*Gracias por todo el apoyo que me has dado y por los momentos que hemos pasado juntos te quiero mucho.*

### ***A las familias:***

*Trujillo Arce  
Varela Ríos*

*Gracias por el apoyo incondicional que me han brindado.*

Y. T. V.

## AGRADECIMIENTOS

A la Doctora Patricia Ramos Morales, por todo el apoyo, confianza y conocimientos que me ha dado, y sobretodo por adentrarme en el maravilloso mundo de la genética y de las moscas, gracias Paty.

A mis amigas incondicionales: Ariadna, Leticia, Linda y Martha gracias por todo el apoyo que me brindaron durante este camino, ¡¡gracias compañera!! Gracias chicas por todos esos momentos divertidos, estresantes, de trabajo, de relajo, de viajes, y por todas esas comidas, ¡¡gracias, las quiero mucho!!.

A Gabriela y a Kahorik gracias por el apoyo y los momentos divertidos y estresantes que pasamos juntas tanto en el laboratorio como en experimenta.

Al Biólogo Hugo Rivas, gracias por ser parte de mi formación profesional, por toda la ayuda, el apoyo y la amistad que me brindaste, muchísimas gracias.

Gracias a mis sinodales a la Dra Reyna Hernández, al M. en C. Alfonso Vilchis y a la Dra Ana Sosa, por sus valiosos comentarios y sugerencias hacia mi trabajo.

Gracias al M. en C. Armando Muñoz por el apoyo y comentarios que me dio para este trabajo y por las enseñanzas y la confianza que me brindaste.

Gracias a la M. en C. Adriana Muñoz y a la Bióloga Blanca Hernández por las enseñanzas y experiencias que me brindaron, muchas gracias.

A mis compañeros de laboratorio y los que ya no están, por los momentos divertidos que pasamos juntos: Romina, Pepe, Hugo, Julieta, Rosalba, Tulio, Diana, Donaji, Carmen, Claudia, Julia, Ramsés, Maju. ¡¡Gracias por todo!!

Gracias a todos los amigos, compañeros y maestros de la Facultad por las enseñanzas, las prácticas de campo y los momentos divertidos que me brindaron, sin ustedes no hubiera llegado a este momento, gracias.

Gracias a todos mis tíos, primos y a mis abuelitos por todo el cariño el apoyo y los consejos que me han dado y que a pesar de que algunos se encuentran lejos, eh contado con su apoyo, estoy muy orgullosa de formar parte de una gran familia, los quiero mucho.

Gracias al banco de moscas de la Facultad de Ciencias de la UNAM por la donación del material biológico utilizado en este trabajo.

Y finalmente quiero agradecer a la UNAM por abrirme sus puertas para que pudiera llegar a ser una profesionista y mejor persona muchísimas ¡¡GRACIAS!!

Este trabajo fue elaborado en el laboratorio de Genética y Toxicología ambiental de la Facultad de Ciencias de la UNAM.

El material biológico utilizado en este trabajo fue donado por el Banco de Moscas de la Facultad de Ciencias, UNAM.

Gracias a la M. en C. Adriana Muñoz Hernández por el material fotográfico donado.

Gracias al PAPIME EN206803, UNAM por el apoyo económico para la realización de este proyecto.



# ÍNDICE

## RESUMEN

<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>5</b>
1.1 Toxicología .....	5
1.1.1 Toxicología genética .....	6
1.2 Radicales libres y antioxidantes .....	8
1.2.1 Radicales libres .....	8
1.2.2 Antioxidantes .....	10
1.2.3 Biometrix A-OX antioxidante .....	12
1.3 <i>Drosophila melanogaster</i> como modelo biológico .....	14
1.4 Prueba de mutación y recombinación somática SMART.....	17
1.5 N-nitrosodimetilamina NDMA .....	19
<b>2. JUSTIFICACIÓN</b> .....	<b>21</b>
<b>3. HIPÓTESIS</b> .....	<b>22</b>
<b>4. OBJETIVOS</b> .....	<b>22</b>
4.1 Objetivos particulares .....	22
<b>5. METODOLOGÍA</b> .....	<b>23</b>
5.1 Reactivos ó sustancias.....	23
5.2 Sistema de cruzas.....	23
5.3 Obtención de larvas .....	24
5.4 Tratamiento .....	25
5.5 Registro .....	25
5.6 Determinación de la actividad protectora y genotóxica de Biometrix.....	26
5.6.1 Criterios de lectura .....	26
5.6.2 Análisis de la frecuencia de mutación somática y recombinación mitótica.....	27
<b>6. RESULTADOS</b> .....	<b>31</b>
6.1 Índice de sobrevivencia y proporción de sexos.....	31

6.2 Resultados de genotoxicidad del Biometrix .....	38
6.3 Resultados de actividad protectora .....	43
<b>7. DISCUSIÓN.....</b>	<b>47</b>
<b>8. CONCLUSIONES.....</b>	<b>52</b>
<b>9. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>53</b>

## RESUMEN

Existen diversos suplementos alimenticios elaborados a base de plantas o sustancias de origen natural que se caracterizan por tener cualidades terapéuticas o preventivas para la salud, pero que se utilizan sin prescripción médica. La seguridad de un remedio herbolario o un suplemento alimenticio depende en gran parte de su uso adecuado y este uso lo determina con frecuencia el propio consumidor.

En el presente trabajo se evaluó la toxicidad y genotoxicidad de BIOMETRIX<sup>®</sup> A-OX<sup>®</sup> (BX), Antioxidante (Schering-Plough, S.A de C.V.) así como también la actividad protectora ante el daño inducido por el promutágeno de referencia N-nitrosodimetilamina (NDMA) en *Drosophila melanogaster*. Se evaluó la inducción de mutación y recombinación somática en las células que dan origen a las alas, permitiendo detectar si a lo largo del desarrollo larvario ocurre alguna alteración que cambie la información genética de las células y derive en la formación de tricomas mutantes en las células de las alas de las moscas. Se emplearon larvas de  $72 \pm 4$  hrs con marcadores fenotípicos para evaluar la inducción de mutación y recombinación somática y larvas de tipo silvestre (como testigo) que se expusieron por alimentación a un tratamiento agudo (6 hrs.) de sacarosa ó NDMA y posteriormente, a un tratamiento subcrónico (42 hrs.) de diferentes concentraciones realizadas por diluciones sucesivas de BX A-OX [0.625 %–80 %]. Se obtuvieron los índices de sobrevivencia (IS) y la proporción de sexos de los organismos recobrados (PSx), y posteriormente se obtuvo la frecuencia de mutación y recombinación somáticas para lo cual, las alas de las moscas se montaron en laminillas para cuantificar la presencia de manchas mutantes de los tratamientos Sacarosa + BX (para determinar la genotoxicidad de BX) ó de NDMA + BX (para determinar la actividad protectora). El BX fue tóxico en concentraciones altas (40 y 80 %) y genotóxico para las concentraciones 5% y 40%. En el tratamiento NDMA + BX se acentuó el efecto tóxico del BX y la frecuencia de manchas inducidas por la NDMA también se incrementó con BX en concentraciones bajas generando un efecto potenciador; en contraste, en las concentraciones altas se obtuvo menor

frecuencia de manchas. La distribución del tamaño de mancha obtenido en las series experimentales, así como la distribución del número de manchas por mosca indica que la reducción de la frecuencia de mutación no se debe a un efecto protector sino a un efecto citotóxico. El tratamiento con BX afectó significativamente la sobrevivencia de los organismos, además incrementó la frecuencia de mutación somática de la NDMA en bajas concentraciones y no disminuyó la frecuencia de daño genotóxico de la NDMA. BX resultó ser genotóxico en el sistema *in vivo* de *Drosophila melanogaster*.

# **1. INTRODUCCIÓN**

## **1.1 Toxicología**

La toxicología es el estudio de los efectos que ejercen las sustancias sobre los organismos (Klaassen y Watkins, 2005). Además de determinar las propiedades tóxicas de estas sustancias y establecer sus mecanismos de acción, trata de identificar las condiciones de uso en la que los organismos tienen el menor riesgo de ser dañados (Muñoz, 2007).

Un agente tóxico es cualquier sustancia capaz de provocar una respuesta nociva en un sistema biológico, mientras que un xenobiótico es un compuesto externo a un organismo que interacciona con él, y ocasiona generalmente alteraciones metabólicas (Klaassen y Watkins, 2005).

Para que una sustancia provoque efectos tóxicos en un sistema biológico es necesario que dicha sustancia o sus metabolitos (Biotransformación) alcancen el lugar apropiado y permanezcan en él durante un tiempo suficiente en una concentración biológicamente significativa para producir una manifestación tóxica (Klaassen y Watkins, 2005). El que haya una respuesta tóxica va a depender de las características físicas y químicas de la sustancia, del lugar de la exposición, de la biotransformación del agente por parte del sistema y de la sensibilidad del propio organismo expuesto; así, muchos agentes pueden inducir diversos efectos en los órganos y organismos (Timbrell, 2002). Las principales vías por las que los organismos se exponen a los agentes son: por ingestión, inhalación y contacto, aunque también la administración de sustancias por vías artificiales como la inyección (intramuscular, intravenosa, subcutánea e intraperitoneal) es relevante (Klaassen y Watkins, 2005).

La biotransformación es la conversión metabólica de las sustancias químicas y xenobióticas a compuestos más hidrosolubles. Ésta es realizada mediante dos fases durante las cuales intervienen varias familias de enzimas localizadas principalmente en el retículo endoplasmático y en el citosol (Espinoza, 2007).

Según Silbergeld, (2001) las reacciones de fase I suelen consistir en la oxidación del compuesto lo que lo hace más hidrosoluble. Estas reacciones exponen o introducen un grupo funcional (-OH, -NH<sub>2</sub>, -SH<sub>2</sub> o -COOH).

En la fase II se incluyen reacciones de conjugación en las que el compuesto oxidado (sustancia original o metabolito de la Fase I) se conjuga con una molécula endógena. Esta reacción incrementa aún más su hidrosolubilidad facilitando así su excreción del organismo y reduciendo la magnitud del daño a las células del tejido blanco.

Estos procesos reducen la cantidad de sustancia disponible en el organismo, así como el tiempo de permanencia del xenobiótico y, por lo tanto, la magnitud del daño probable a las células del tejido blanco, aunque también pueden generar metabolitos con actividad genotóxica.

### **1.1.1 Toxicología Genética**

La toxicología genética estudia los efectos que ejercen los agentes químicos, físicos y biológicos, sobre el ADN y en los procesos genéticos de las células y organismos vivos. De manera general, tiene como objetivo la implementación de pruebas y métodos de evaluación para definir el impacto de agentes genotóxicos encontrados en el ambiente y cuya presencia puede implicar daño a la integridad del genoma de los organismos (Klaassen y Watkins, 2005).

Un agente genotóxico es aquel que altera la integridad del material hereditario. Los genotóxicos pueden inducir lesiones al ADN que van desde roturas sencillas o dobles del ADN, entrecruzamientos (entre las bases, entre bases y proteínas) hasta la adición de compuestos químicos a las bases del ADN (Fig.1). Estas alteraciones intervienen con la división y organización celular y, dependiendo del linaje celular afectado, pueden inducir eventos de mutagénesis, teratogénesis o carcinogénesis (Winder, 1993; Muñoz, 2007).

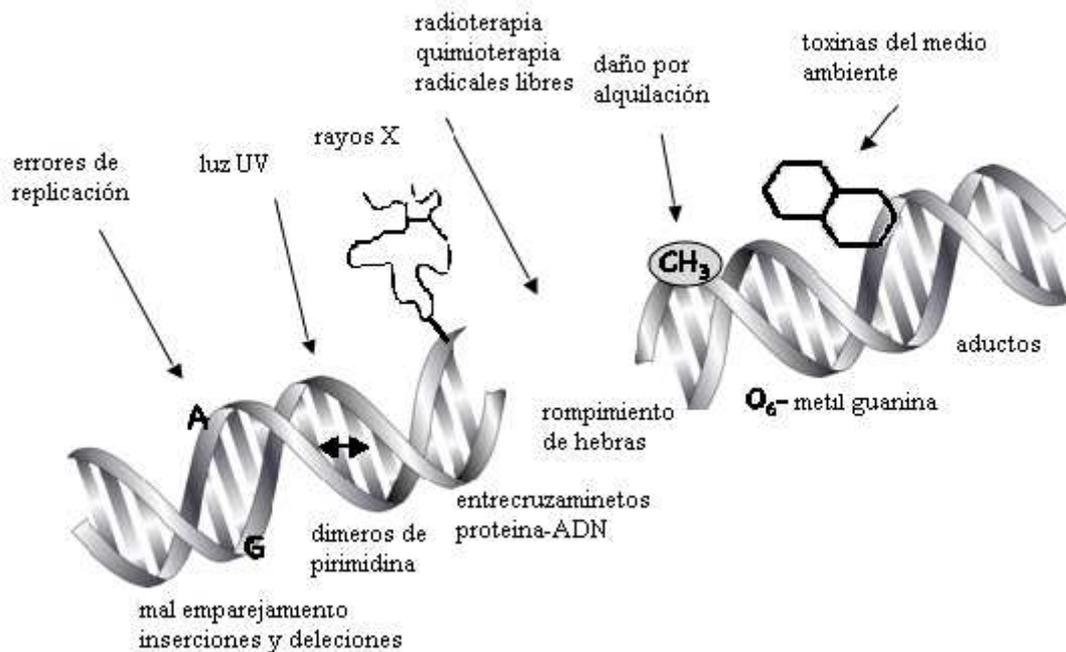


Figura 1. Tipos de daño al ADN (Modificado de Rouse, 2008).

Hay procesos que permiten a la célula contrarrestar gran cantidad de daño al ADN. Si el daño al material genético es considerable o la reparación de éste no resulta eficiente, la célula puede ser eliminada por mecanismos como la apoptosis. En ocasiones, la reparación de las lesiones no es libre de error pero mantiene la viabilidad celular y si es el caso, la capacidad de proliferación de la célula reparada (Winder, 1993).

Entre los mecanismos de reparación del daño al ADN se encuentran:

- Reparación por escisión de bases – elimina la (s) base(s) dañada (s).
- Reparación por escisión de nucleótidos – elimina los oligonucleótidos dañados.
- Reparación de roturas bicatenarias – por medio de recombinación homóloga y la unión de extremos no homólogos.
- Recombinación homóloga – produce dos moléculas de DNA (con o sin entrecruzamiento).

- Reparación por 6-O– metilguanina-ADN- metiltransferasa – Protege a las células contra los efectos tóxicos de alquilantes eliminando específicamente grupos metilo de la guanina (Klaassen y Watkins, 2005).

## **1.2 Radicales libres y antioxidantes**

### **1.2.1 Radicales libres**

Los radicales libres (RL) cumplen una función importante en varios procesos homeostáticos, actúan como intermediarios en reacciones de oxidación-reducción (redox) esenciales para la vida. Las concentraciones bajas de RL son benéficas e incluso indispensables para los organismos, sin embargo, en cantidades excesivas éstos son tóxicos, ya que al oxidar moléculas biológicas las alteran y desencadenan trastornos en el metabolismo celular. Un RL representa cualquier especie química de existencia independiente que posee uno o más electrones desapareados (un número impar) girando en sus orbitales atómicos externos (Halliwell, 1997). Esta configuración, electroquímicamente inestable, le confiere la propiedad de ser una especie química altamente reactiva y de corta vida (Chihuailaf *et al.*, 2002).

Un RL puede originarse por distintos mecanismos, pero el más frecuente ocurre mediante la adición de un electrón a una molécula estable. Una vez formados, los RL interactúan con otras moléculas a través de reacciones redox hasta alcanzar una configuración electrónica estable (Sánchez y Mendoza, 2003).

Los RL se han clasificado de acuerdo con el grupo funcional presente en la molécula. El tipo más frecuente de encontrar es el RL del oxígeno, en cuya estructura está presente el oxígeno como centro funcional. Con menor frecuencia se producen los radicales sulfidriilo, que se caracterizan por contener azufre como grupo reactivo. Se han descrito otros radicales que contienen carbono, fósforo o nitrógeno como centro reactivo (Chihuailaf *et al.*, 2002).

Debido a la relevancia del oxígeno en los procesos aeróbicos, los RL con oxígeno reactivo son los más comunes. La mayoría de ellos proceden de las reacciones metabólicas normales y se pueden incrementar por efecto de factores exógenos. Este grupo está constituido por el anión superóxido ( $O^{\cdot-}$ ), el radical hidroxilo ( $OH^{\cdot}$ ) y los RL derivados de compuestos orgánicos: peróxido ( $ROO^{\cdot}$ ) alcoxilo y oxígeno excitado. También se incluyen los compuestos reactivos tales como el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ). Esto último ha llevado a preferir la denominación general de Especies Reactivas del Oxígeno (ERO) con el fin de incorporar a aquellas especies químicas que se comportan como oxidantes ( $H_2O_2$ , ácido hipocloroso ( $HClO$ ), hidroperóxidos y metabolitos epóxido) y que no son RL (Chihuailaf *et al.*, 2002).

Una vez formados, los RL interactúan con otras moléculas a través de reacciones redox. En estas reacciones ocurren transferencia de electrones entre las especies químicas participantes. Una de ellas cede electrones libres (proceso denominado oxidación) y otra, necesariamente, los recibe (proceso denominado reducción). Cuando un RL reacciona con una molécula no radical puede ceder o aceptar electrones, o simplemente puede unirse a ella. En cualquiera de estos casos la molécula no radical se convierte en un RL y se desata una reacción en cadena: un RL genera a otro RL. Sólo cuando se encuentran dos RL la reacción en cadena se detiene (Sánchez y Mendoza, 2003).

La mayoría de las moléculas biológicas pueden ser oxidadas por la acción de los RL, estas moléculas biológicas son: lípidos, proteínas y ADN (Figura 2).

Los organismos aeróbicos poseen un sistema antioxidante protector que limita la acción nociva de los RL. Este sistema protector se compone de enzimas y nutrimentos esenciales cuya función es evitar la formación de RL, capturar aquellos que se han formado y remover o reparar las biomoléculas dañadas (Chihuailaf *et al.*, 2002).

En los organismos la generación de RL y la defensa antioxidante (AO) se encuentran en equilibrio; al romperse este equilibrio se crea una situación

llamada estrés oxidativo, que puede producir daño celular, desencadenar trastornos fisiológicos y favorecer la ocurrencia de procesos patológicos (Sánchez y Mendoza, 2003).

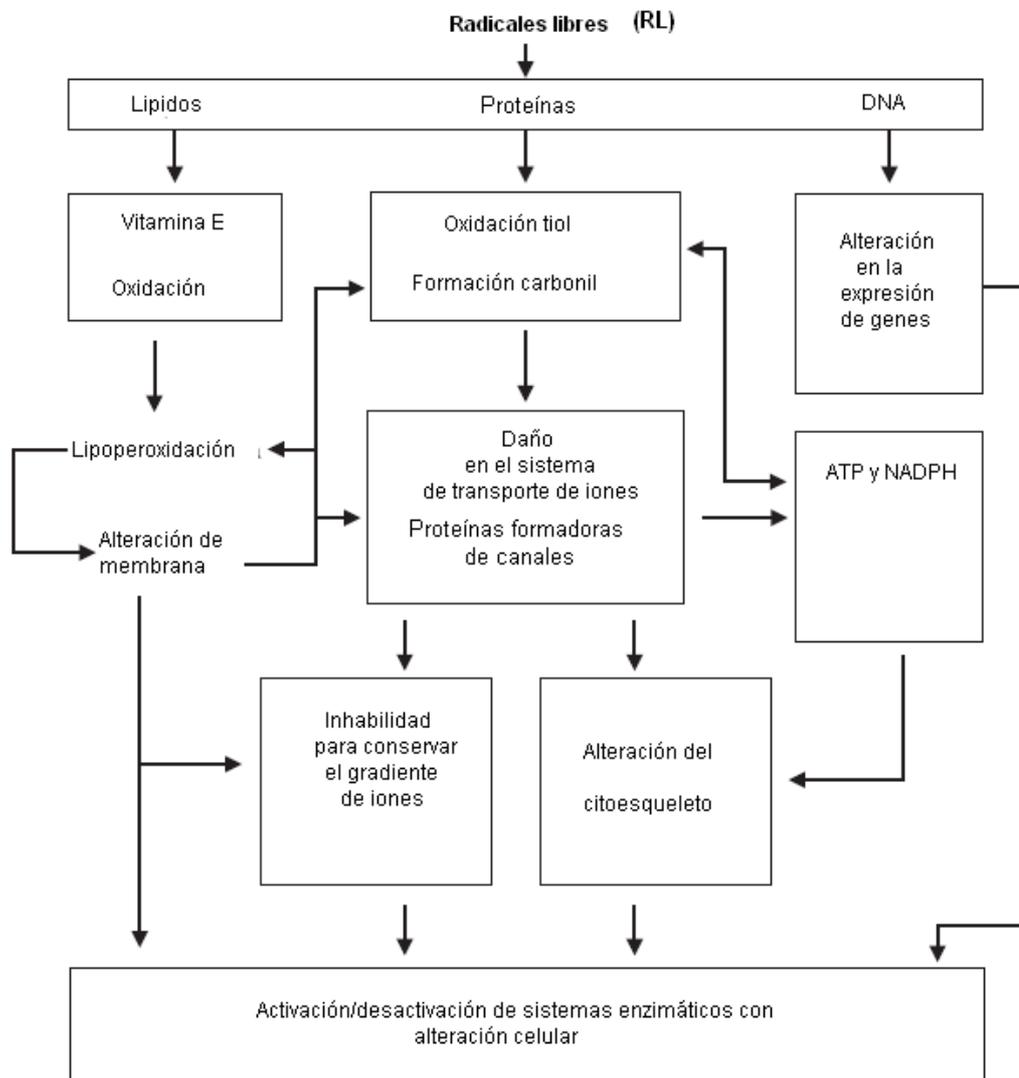


Figura 2. Mecanismos involucrados en el daño celular ocasionados por los RL (Modificado de Chihuilaf *et al.*, 2002).

### 1.2.2 Antioxidantes

Durante los procesos metabólicos, los RL y las ERO se producen constantemente en forma inevitable, sin embargo, las células modulan su presencia mediante los antioxidantes (AO), que son moléculas que interfieren con la formación descontrolada de RL o inhiben sus reacciones con moléculas biológicas (Sánchez y Mendoza, 2003).

Muchos de los AO son enzimas o nutrientes esenciales, que incorporan sustancias indispensables en la estructura de sus moléculas, entendiendo a estas últimas como compuestos que deben ser ingeridos porque el organismo es incapaz de sintetizarlos. Los antioxidantes se pueden agrupar de acuerdo con su función en primarios secundarios y terciarios (Figura 3) (Chihuailaf *et al.*, 2002).

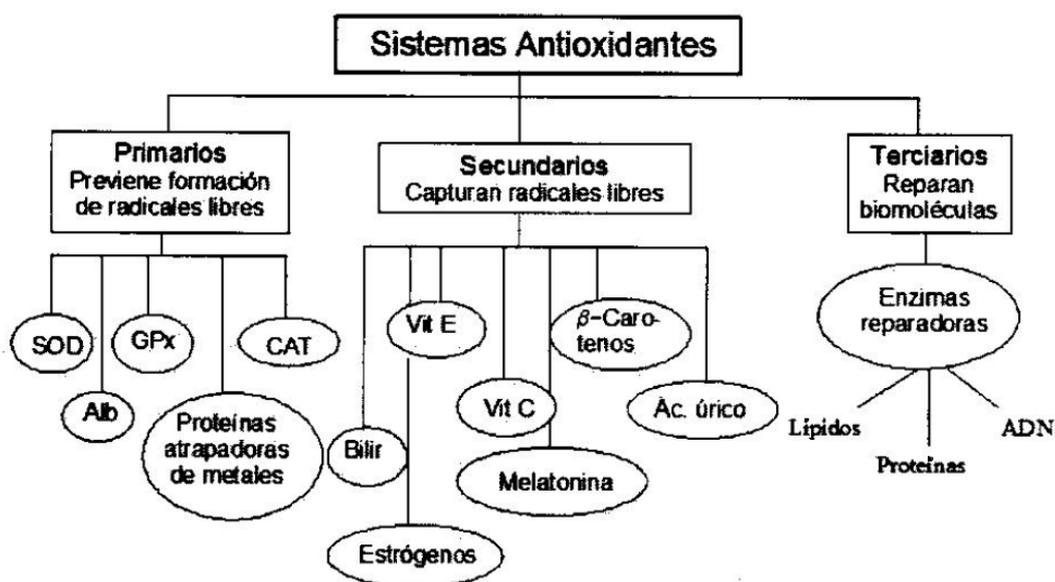
Las enzimas y proteínas antioxidantes son el primer nivel de protección ya que previenen la formación de RL evitando así el daño oxidativo (Sánchez y Mendoza, 2003). Hay tres mecanismos por los cuales se lleva a cabo su acción:

- Descomponiendo enzimáticamente los hidroperóxidos formados y el  $H_2O_2$  generado por medio de enzimas como la catalasa (CAT), Glutación Peroxidada (GPx).
- Quelando iones metálicos por proteínas como la transferrina, ferritina, celuloplasmina, albúmina y metalotioneínas.
- Removiendo o depurando enzimáticamente a las ERO que han sido formadas con enzimas como la Superóxido Dismutasa (SOD)

Cuando el nivel de AO primarios ha sido rebasado, el organismo tiene un segundo nivel de protección que son los antioxidantes secundarios. El papel de los AO secundarios es “atrapar” a los RL que se han formado, impidiendo así la iniciación de una cadena oxidativa o interrumpiendo su propagación (Sánchez, 2003). Los AO secundarios se dividen en dos grupos:

- Hidrofílicos: vitamina C, ácido úrico, bilirrubina y albúmina.
- Lipofílicos: vitamina E, melatonina, estrógenos, vitamina A y carotenoides.

Si los otros dos sistemas de AO no son eficientes y las biomoléculas son oxidadas, las células inducen la expresión de una serie de enzimas que conforman los sistemas de reparación, estos son los AO terciarios, estos sistemas incluyen enzimas encargadas de restaurar directamente las biomoléculas a su conformación nativa, también incluyen enzimas catabólicas que pueden específicamente degradar las moléculas no funcionales. Dentro del sistema se encuentran enzimas reparadoras de lípidos (Fosfolipasas, Glutación transferasa, Acetil transferasa y GPx), proteínas (Proteasas, Proteinasas y Peptidasas) y de ADN (Endo y Exonucleasas, Glicosilasas y ligasas) (Sánchez y Mendoza, 2003).



SOD: superóxido dismutasa; GPx: glutación peroxidasa; CAT: catalasa; Alb: albúmina; Bilir: bilirrubina

Figura 3. Clasificación de los sistemas antioxidantes (Sánchez y Mendoza, 2003).

### 1.2.3 BIOMETRIX® A-OX®, Antioxidante.

BIOMETRIX® A-OX® (BX) Antioxidante (Schering-Plough, S.A de C.V.), (Fig. 4) es un suplemento alimenticio auxiliar contra los efectos del deterioro y envejecimiento celular causado por los radicales libres, ya que en este producto se combinan las principales vitaminas y minerales antioxidantes.

Los suplementos alimenticios son productos a base de hierbas, extractos vegetales, alimentos tradicionales, deshidratados o concentrados de frutas adicionados o no, de vitaminas o minerales, que se pueden presentar en forma farmacéutica y cuya finalidad de uso sea incrementar la ingesta dietética total,

complementarla o suplir alguno de sus componentes (capítulo II de la ley general de salud , 2009).

Este suplemento está indicado para el tratamiento de las manifestaciones que acompañan a los procesos de disminución de la capacidad física, como debilidad, cansancio, falta de atención, falta de energía, entre otros. Mejora el desempeño en condiciones de estrés ayudando a mantener el equilibrio.

Cada cápsula contiene:

- Acetato D,L alfatocoferol (vitamina E) (200 mg)
- Ácido ascórbico (vitamina C) (200 mg)
- Levadura de selenio (0.5 mg de selenio)
- Extracto estandarizado de *Ginkgo biloba* (al 24% de glucósidos)
- Extracto estandarizado de *Panax ginseng* (al 5.3% de ginsenósidos)



Figura 4. BIOMETRIX<sup>®</sup> A-OX<sup>®</sup>, Antioxidante.

Vitamina E: Debido a que es una molécula lipofílica, actúa en las membranas celulares y en las partículas de lipoproteínas; inhibe especialmente a la lipoperoxidación al remover radicales peróxido lipídicos ( $LOO^{\cdot}$ ) formando hidroperóxidos lipídicos y un radical  $\alpha$ -tocoferilo el cual es menos reactivo con los ácidos grasos polinsaturados vecinos rompiendo así su propagación. También atrapa  $O_2$  (Sánchez y Mendoza, 2003).

Vitamina C: Se encuentra bajo la forma de ascorbato, distribuido intra y extracelularmente. Reacciona en forma directa con los  $RL O^{\cdot}$ ,  $OH^{\cdot}$  y varios hidroperóxidos lipídicos. A pesar de su manifiesta propiedad AO, el ascorbato puede desempeñarse como un potente pro-oxidante en presencia de excesivas concentraciones de iones  $Fe^{+3}$  y  $Cu^{+2}$  (Chihuailaf *et al.*, 2002).

Selenio: es un potente antioxidante, contribuye a proteger a las células del daño provocado por los peróxidos; de hecho, la enzima GPx que interviene en

la destrucción de peróxidos, requiere Selenio para su activación (Sánchez y Mendoza, 2003).

*Ginkgo biloba*: tiene diversos compuestos farmacológicos, principalmente los flavonoides protegen de la isquemia y ejerce efectos antioxidantes, captando radicales libres y previniendo la peroxidación lipídica (Feng *et al.*, 2009).

*Panax ginseng*: La acción antioxidante del ginseng se debe a los ginsenósidos los cuales reducen la autooxidación, previenen la formación de radicales libres, aumentan la acción de enzimas celulares y la eliminan directamente los radicales libres (Kitts y Hu, 2009).

### **1.3 *Drosophila melanogaster* como modelo biológico**

Uno de los modelos biológicos utilizado en la toxicología genética es *Drosophila melanogaster* o mosca del vinagre, la cual ha sido utilizada en estudios de genética y mutagénesis durante más de 100 años.

Dada su relevancia, en el año 2000 fue completada la secuencia del genoma de *Drosophila melanogaster* (Adams *et al.*, 2000). Este hecho, junto con la multitud de técnicas y herramientas moleculares para su análisis, ha permitido consolidar a *Drosophila* como un sistema experimental *in vivo* de suma importancia.

*Drosophila melanogaster* también permite la detección de la mayoría de los eventos genéticos inducidos como por ejemplo, la sustitución de pares de bases, no disyunción, mutaciones puntuales, inversiones o translocaciones cromosómicas, recombinación y otros efectos, tanto en células somáticas como en germinales, esto gracias a diferentes metodologías (Graf *et al.*, 1984; Vogel y Zijlstra, 1987; Zainullin *et al.*, 1992; Ramos *et al.*, 2000).

*Drosophila* posee actividad metabólica (activación – desintoxicación) con la que es capaz de transformar gran variedad de xenobióticos (Baars *et al.*, 1980; Kilbey *et al.*, 1981). También posee enzimas dependientes de citocromos P450

cuya actividad se ha probado que es similar a la encontrada en la fracción S9 del hígado de mamíferos (Vogel, 1975; Hällström et al., 1981 a, b; 1982; Clark, 1982); por lo que muestra alta eficiencia en la detección de metabolitos de vida corta ya que no requiere de la adición de un sistema metabólico exógeno (Zijlstra y Vogel, 1988 a, b). Por todo lo anterior *Drosophila melanogaster* es considerada una valiosa especie no-mamífero para pruebas *in vivo* de sustancias con actividad genotóxica (Zimmering et al., 1987).

Entre las principales ventajas de este organismo modelo se encuentran un ciclo de vida corto (10 días aproximadamente a 25 °C) (Figura 5), descendencia abundante, además de que el medio de cultivo y mantenimiento es de bajo costo; en el estadio larvario la presencia de cromosomas gigantes en las glándulas salivales y un número cromosómico bajo ( $2n = 8$ ).

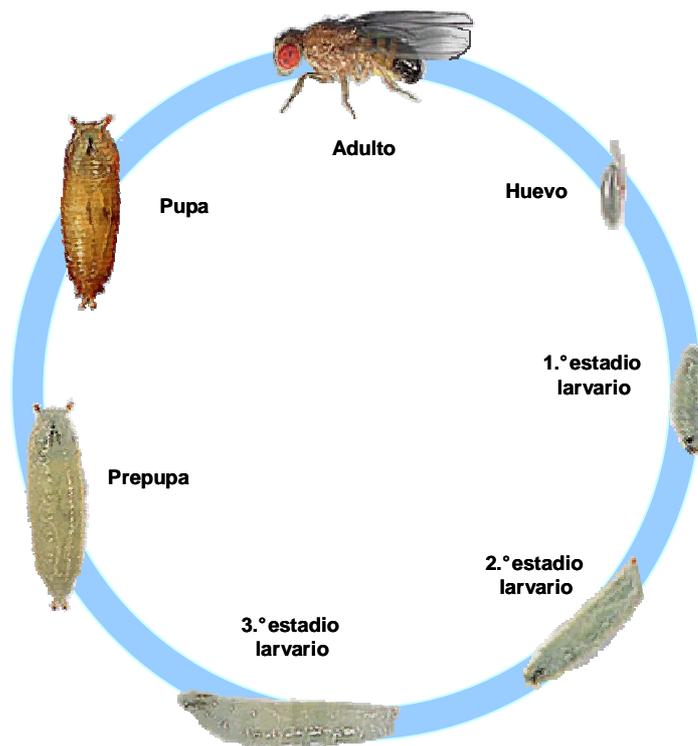


Figura 5. Ciclo de vida de *Drosophila melanogaster* (Modificado de Flymove,2008.)

*Drosophila melanogaster* pertenece a los insectos holometábolos, con metamorfosis completa y estadios de desarrollo bien definidos además una característica muy importante es su claro dimorfismo sexual en organismos adultos.

Las larvas presentan dos tipos celulares: larvario e imagal (adulto), el primero está implicado exclusivamente con su desarrollo larvario y su funcionamiento mientras que el imagal está formado por paquetes de células que se conocen como discos imagales, los cuales durante el desarrollo larvario, eventualmente se diferencian en estructuras particulares del cuerpo del adulto, antenas ojos, alas, patas, halterios genitales externos y otros (Figura 6). Las células precursoras que forman estos discos son alrededor de 10 a 40 al final del desarrollo embrionario. Éstas se amplifican numéricamente por mitosis en momentos específicos durante el desarrollo larvario; en los discos imagales de las alas, la última ronda de división ocurre a las 24 h después de la formación del pupario (Bate y Martínez-Arias, 1991; Cohen, 1993, Amoros, 2006).

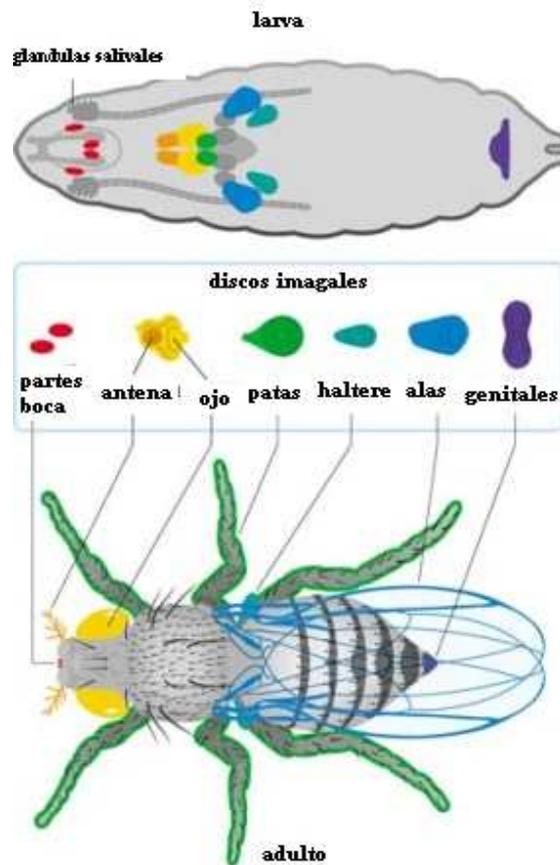


Figura 6. Ubicación de los discos imagales de *Drosophila melanogaster* (Modificado de Klug, 2006).

#### **1.4 Prueba de Mutación Somática y de Recombinación Mitótica (Somatic Mutation and Recombination Test, SMART)**

La metodología SMART (por sus siglas en inglés) fue desarrollada por Graf *et al.* en 1984. Detecta la actividad mutagénica y recombinogénica de compuestos así como de mezclas complejas en células somáticas de *Drosophila melanogaster* (Graf *et al.*, 1984; Dorantes, 2000; Ramos *et al.*, 2000). Se basa en el empleo de células de los discos imagales que posteriormente darán origen a las alas de la mosca. Estas células están determinadas genéticamente y al diferenciarse, cada una dará origen a un tricoma, que crece gradualmente; finalmente la célula muere y sólo se observa el tricoma en la superficie de las alas (Demerec, 1965; García-Bellido y Merriam, 1971; García-Bellido y Dapena, 1974).

Debido a que las células que darán origen a las alas están determinadas genéticamente se puede detectar si a lo largo del desarrollo larvario ocurre alguna alteración que cambie la información genética, el cambio será transmitido a las células hijas dando origen a una mancha distinguible formada por células ó tricomas mutantes en un contexto de células silvestres (Graf *et al.*, 1984).

Esta metodología se basa en la pérdida de heterocigosis de los genes marcados en las células de los discos imagales de las alas de larvas de *Drosophila melanogaster*. Los eventos genéticos que detecta la prueba SMART son: mutación puntual, recombinación, pérdida de ADN y no disyunción (Fig. 7). Estos eventos pueden conducir a la pérdida del alelo dominante (silvestre), es decir a la pérdida de heterocigosis, lo que permite la expresión de uno o ambos genes recesivos (Graf *et al.*, 1984).

Se utilizan marcadores morfológicos de los pelos de las alas del adulto, de manera que su expresión permita distinguir manchas mutantes en el contexto silvestre de las alas de las moscas. Los marcadores genéticos son *flr<sup>3</sup>* (flare) y *mwh* (multiple wing hair).

Eventos inducidos en la fase de mitosis		Fenotipos recuperados
		<p>tricomas silvestres</p>
Mutación puntual		<p>silvestres</p> <p><i>mwh</i></p>
Delección		<p>silvestres</p> <p><i>mwh</i></p>
Recombinación entre <i>flr3</i> y el centrómero		<p><i>mwh</i></p> <p><i>flr3</i></p>
Recombinación entre <i>mwh</i> y <i>flr3</i>		<p><i>mwh</i></p> <p>silvestres</p>

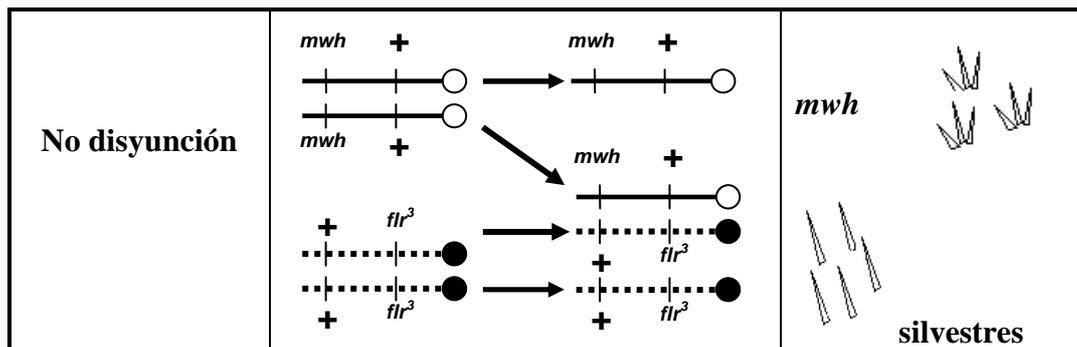


Figura 7. Eventos genéticos inducidos en la prueba SMART (Modificado de Graf *et al.* 1984).

Los eventos de mutación, delección y recombinación entre *mwh* y *flr<sup>3</sup>*, conducen a manchas en las que se observará la expresión de uno de los marcadores mutantes y por lo tanto se le considera una mancha simple. A partir de un evento de recombinación entre el centrómero y el marcador *flr<sup>3</sup>* (por ser más próximo al centrómero), se formará una mancha gemela con los fenotipos *flr<sup>3</sup>* y *mwh*. El número de manchas mutantes aparecen en las moscas adultas indicando la frecuencia de los eventos genéticos y el tamaño de mancha indica el tiempo de acción del compuesto durante la embriogénesis (Ramel, 1991).

Con la prueba SMART se han evaluado a más de 400 compuestos y puede ser usada para detectar genotóxicos en la forma de contaminantes aéreos y mezclas complejas, entre otros (Vogel y Szakmary, 1990; Ramos 1994).

### 1.5 (N-Nitrosodimetilamina) NDMA

La NDMA se utilizó como un promutágeno de referencia para inducir daño en el ADN, es un líquido aceitoso amarillo, el cual es formado en la industria y en los procesos naturales, también se forma de nitratos y nitritos en la dieta humana y en varios alimentos, así como en el humo de cigarro, cosméticos y en bebidas alcohólicas (Andreas y David 2003; Environmental Protection Agency, 2006).

La N-nitrosodimetilamina es considerada altamente promutagénica y carcinogénica, es un agente alquilante que metila a los oxígenos de la citosina

y la guanina del ADN. La NDMA es biológicamente inerte pero los metabolitos generados durante su biotransformación son asociados a su genotoxicidad (Williams ,1989) (Figura 8).

La NDMA sufre una desmetilación oxidativa que la transforma a hidroxidimetilamina inestable, esta molécula origina un ion alquidiazonium y un ion metildiazohidróxido que es la molécula reactiva (Williams ,1989).

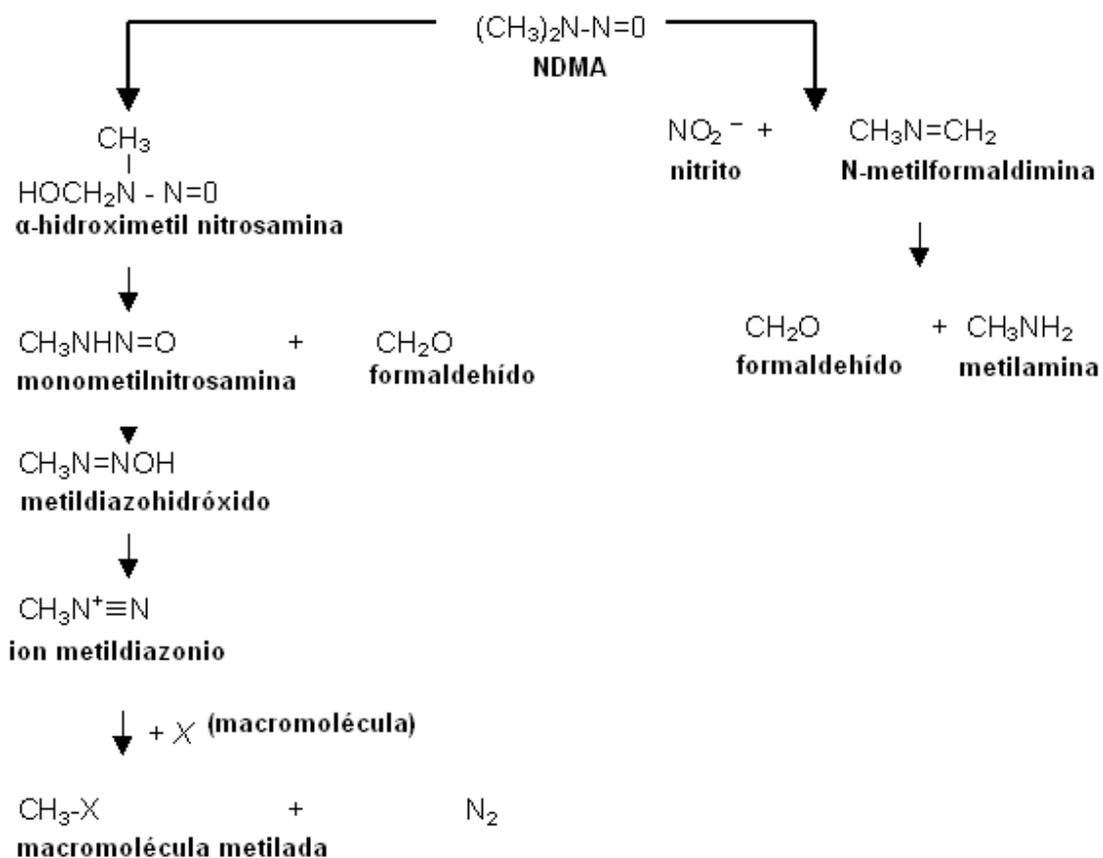


Figura 8. Ruta metabólica de N-NDMA (Modificado de Environmental Protection Agency, 2006).

La otra ruta identificada del metabolismo de la NDMA es la de denitrosación. La NDMA es primeramente metabolizada en una imina intermedia inestable y en óxido nítrico ( $\text{NO}\cdot$ ), el ion imina se descompone en formaldehído y metilamina, cuando el óxido nítrico se combina con el oxígeno forma el nitrato ( $\text{NO}_2^-$ ) (DRAFT, 2006).

## 2. JUSTIFICACIÓN

En años recientes se ha incrementado el uso de remedios herbolarios y suplementos alimenticios sin prescripción médica, particularmente si estos son de origen natural. Esto en gran parte se debe a que la población va asumiendo responsabilidad de cuidar su salud, pero también se debe al gran impacto que ejercen los medios de comunicación.

La seguridad de un suplemento alimenticio de venta sin prescripción médica, depende en gran parte de su uso adecuado y este uso lamentablemente lo determina con frecuencia el propio consumidor, por lo que cabe un margen de error, ya que lo que funciona para unas personas puede no funcionar para otras aunado a la necesidad de evaluar si los consumidores realmente necesiten esos suplementos.

Otro problema es que generalmente, las etiquetas de los productos de venta sin prescripción médica no facilitan la lista completa de las posibles reacciones adversas que pueda ocasionar su consumo, además de que existen muchos productos de venta sin receta que pueden interactuar adversamente con una amplia gama de medicamentos, o el que no se considere que se requieren dosis diferentes para una población determinada, es decir las personas de edad avanzada son más vulnerables que los jóvenes a los efectos adversos y a las interacciones de medicamentos.

Si bien en algunos países se desarrollan suplementos, en México productos como Biometrix dominan el mercado.

Por todo lo anterior se considera importante evaluar la actividad protectora del vitamínico BIOMETRIX® A-OX®, Antioxidante. Schering-Plough, S.A de C.V. , como auxiliar contra los efectos del deterioro y envejecimiento celular.

### **3. HIPÓTESIS**

Si el antioxidante BIOMETRIX<sup>®</sup> A-OX<sup>®</sup>, es atrapador de radicales libres que dañan a la célula, entonces este producto disminuirá el daño genotóxico producido por la N-nitrosodimetilamina en *Drosophila melanogaster*.

### **4. OBJETIVO**

Evaluar si BIOMETRIX<sup>®</sup> A-OX<sup>®</sup>, se puede emplear como un complemento que ayuda a evitar que radicales libres dañen a la célula y por lo tanto también al DNA.

#### **4.1 Objetivos particulares**

1. Determinar la toxicidad y el potencial genotóxico de BIOMETRIX<sup>®</sup> A-OX<sup>®</sup>, en el sistema *in vivo* de *Drosophila melanogaster*.
2. Evaluar la actividad protectora de BIOMETRIX<sup>®</sup> A-OX<sup>®</sup>, ante el daño genotóxico inducido por NDMA.

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1 Reactivos ó sustancias

Se utilizó el compuesto NDMA (N-Nitrosodimetilamina) (Sigma-Aldrich®) como un promutágeno de referencia (CAS, 62-75-9), así como el vitamínico .BIOMETRIX® A-OX®, Antioxidante (Schering-Plough, S.A de C.V.) y sacarosa al 5%.

### 5.2 Sistema de cruzas

Para la evaluación de la inducción de mutación y recombinación somática se utilizaron dos cepas mutantes (cruza estándar) de *Drosophila melanogaster* las cuales son, *flr<sup>3</sup>/TM3, Bd<sup>Ser</sup>* y *mwh, e / mwh, e* (protocolo modificado de Graf *et al*, 1984).

El marcador *flr<sup>3</sup>* está ubicado en el cromosoma 3 a una distancia del centrómero de 38.8 unidades de mapa (um) y se caracteriza porque los tricomas son transformados en pequeños crecimientos irregulares en forma de flama o de una mancha quitinosa sobre la superficie del ala. (García Bellido y Dapena, 1974). Este gen es autosómico recesivo y letal en condición homocigótica (Lindsley y Zimm, 1992; Graf *et al.*, 1984), por lo que se requiere utilizar un cromosoma balanceador para mantenerlo estable.

El cromosoma balanceador es *TM3, Bd<sup>Ser</sup> [In (3LR)-TM3, y<sup>+</sup> ri p<sup>d</sup> sep bx<sup>34e</sup> e<sup>s</sup> Ser]*, el cual tiene múltiples inversiones pericéntricas que involucran a gran parte del cromosoma 3, por consecuencia impide que se recobren productos viables de entrecruzamientos entre los cromosomas homólogos, permitiendo estabilizar al alelo *flr<sup>3</sup>*. Para distinguir la presencia de este balanceador se utiliza al marcador *Bd<sup>Ser</sup>* el cual, al ser dominante permite reconocer a los organismos portadores, los cuales muestran alas con bordes disperejos. *Bd<sup>Ser</sup>* también es un gen letal en condición homocigota por lo que se establece un sistema de letales balanceados y en cada generación sólo se recobran organismos heterocigos *flr<sup>3</sup> /Bd<sup>Ser</sup>*.

El marcador *mwh*, está ubicado también en el cromosoma 3 a 0.3 um, es autosómico recesivo, afecta los tricomas de todo el cuerpo y las células de las alas, produce la formación de tricomas múltiples, en vez de uno por célula como en el fenotipo silvestre (Graf *et al.*, 1984; Lindsley y Zimm, 1992). El marcador *e* (*ebony*) es un gen autosómico y recesivo, por lo que sólo las moscas portadoras de balanceador serán homocigóticas y presentarán el cuerpo de color ébano (Lindsley y Zimm, 1992).

Como referencia y para evaluar el impacto del uso de marcadores en el sistema de cruza anterior se empleó la cepa de tipo silvestre Canton-S. Hembras vírgenes, y machos de tipo silvestres fueron cruzados y utilizados como testigo de línea.

### 5.3 Obtención de larvas

De la criza progenitora hembras vírgenes *flr<sup>3</sup> / TM3 Bd<sup>Ser</sup>* y machos *mwh*, se obtienen dos tipos de progenie, moscas trans-heterocigotas libres de inversión y moscas portadoras de múltiples inversiones, Dado que en estado larvario no se distinguen entre sí, ambos tipos de progenie se exponen al mismo tratamiento (Graf *et al.*, 1984). Para el caso de la criza de Canton-S, toda la progenie resultante es silvestre y por lo tanto todas las larvas se exponen al mismo tratamiento.

A partir de la criza progenitora, tanto de la criza *flr<sup>3</sup>/TM3 Bd<sup>Ser</sup>* y machos *mwh* y la de Canton-s, se colectaron huevos transfiriendo la criza en medio fresco por 8 horas, para después obtener larvas de la misma edad de  $72 \pm 4$  horas. Las larvas de  $72 \pm 4$  horas fueron extraídas con el procedimiento de Nöthinger (1970) el cual consiste en separar larvas del medio mediante una solución concentrada de sacarosa al 20%. La solución se vertió en un embudo de separación del que se lograron separar las larvas ya que en esta solución, las larvas flotan porque tienen una densidad menor. Se enjuagaron para eliminar los restos de medio y de la solución de sacarosa y se recibieron en una malla de nylon. En seguida se colocaron grupos de aproximadamente 100 larvas en tubos homeopáticos.

## 5.4 Tratamiento

El tratamiento se administró en dos etapas. En la primera, larvas de 72 h  $\pm$  4 hrs. de edad se colocaron en tubos de 10 ml de capacidad, que en un extremo tenían un pedazo de tela de nylon y en el otro se colocó un tapón de hule espuma, para evitar que las larvas se escapen. Posteriormente estos tubos se colocaron en vasos de precipitados que contenían 0.2 g de celulosa y 2 ml del promutágeno NDMA 5 mM (testigo positivo) o sacarosa al 5% (testigo negativo), este fue un tratamiento agudo por seis horas.

Después del tratamiento agudo, las larvas se enjuagaron con agua corriente y se colocaron en tubos que contenían 1 g de medio instantáneo para mosca (Carolina Biological Supply Company, Burlington, N.C.) y 4.5 ml de agua destilada como testigo ó 4.5 ml de la solución de BX a probar a diferentes concentraciones que van desde [80% a 0.625%], esto es a partir de una cápsula de BX (la cual tiene consistencia espesa y es poco soluble en agua) que se disolvió en agua destilada a una temperatura de 30 °C. Las concentraciones se prepararon por diluciones sucesivas a partir de la mayor concentración probada. Como diluyente y testigo negativo se utilizó agua destilada.

Los tubos se taparon con un tapón de hule espuma y se dejó que las larvas permanecieran en los tubos hasta que se inició la metamorfosis (etapa en la que no ingieren alimento) y posteriormente se recobraron las moscas adultas (tratamiento subcrónico). La exposición total fue: 72x6x48 hrs.

## 5.5 Registro

Las moscas adultas recobradas se fijaron en etanol al 70%. Se registró el número de hembras y machos de Canton-S y de la craza estándar. Las moscas de la craza SMART se cuantificaron por fenotipo: con alas y color de cuerpo tipo silvestre, las moscas libres de inversión (LI), *flr<sup>3</sup>/mwh*, *e* y con muescas en las alas, con color de cuerpo color oscuro moscas portadoras de inversión (PI) *flr<sup>3</sup>/TM3 Bd<sup>Ser</sup>*. A partir de lo anterior se obtuvo el Índice de sobrevivencia (IS) y la proporción de sexos (PSx) con las siguientes fórmulas:

$$\frac{\sum_{i=1}^n \text{experimental}}{\sum_{i=1}^n \text{control}} = \text{I.S. } (i) x$$

El índice de sobrevivencia para hembras o machos (i), en cada dilución probada (x), se expresa como el promedio  $\pm$  el error estándar obtenido a partir de las repeticiones realizadas (Arellano, 2002). Se calculó el índice de sobrevivencia y la proporción sexual para cada uno de los experimentos y se obtuvo el promedio  $\pm$  error estándar (ee).

$$\frac{\text{Número total de } \text{♂} \text{ (experimental)}}{\text{Número total de organismos (♀ y ♂) experimental}} = \text{Proporción Sexual (PSx)}$$

## 5.6 Determinación del posible efecto genotóxico o protector de Biometrix A-OX

Se realizaron preparaciones de las alas recobradas de moscas *flr<sup>3</sup>/mwh*, e. Las alas se separaron con la ayuda de unas pinzas de relojero y se montaron en portaobjetos utilizando solución de Faüre (Graf *et al*, 1984). En cada preparación se montaron 20 alas de hembras y 20 de machos. Se observó cada ala en un microscopio óptico con un aumento de 40X, cada mancha se registró de acuerdo a la sección que se encontraba en el ala (Graf *et al*, 1984), el fenotipo que la formaba ya sea *flr<sup>3</sup>*, *mwh* o ambos.

### 5.6.1 Criterios de lectura

La clasificación de las manchas se hizo siguiendo el criterio de Graf *et al* (1984). Se considera mancha cuando al menos una de las células que la forman muestra 3 o más tricomas, ya que se ha mostrado que los tratamientos con temperatura pueden inducir fenocopias en las que se observan expresiones con dos tricomas pero no con tres o más (Katz, 1985), por esta

razón solo se cuantifican como manchas *mwh* aquellas formadas por tres o más pelos.

Se considera que dos manchas son independientes si se separan entre si por tres o más hileras de tricomas normales. Por otra parte se consideran manchas simples si están formadas por células que expresan cualquiera de los dos marcadores involucrados *flr<sup>3</sup>*, *mwh*; gemelas si se observan ambos marcadores en las células de una mancha.

### **5.6.2 Análisis de la frecuencia de mutación somática y recombinación mitótica.**

Los datos fueron analizados con ayuda del programa de cómputo SMART (que se basa en la prueba no paramétrica  $X^2$  (Würgler no publicado, Graf et al., 1984; Frei y Würgler, 1988, 1995). Para cada concentración y para cada cepa se analizó un total de 120 alas.

Para establecer si existen diferencias entre la frecuencia de manchas entre las moscas testigo y experimentales se contrastan dos hipótesis:

$H_0$ : la frecuencia de manchas de moscas tratadas es igual a la observada en moscas del grupo testigo.

$H_a$ : la frecuencia de manchas inducida en las moscas tratadas es “m” veces la frecuencia de manchas en las moscas testigo (Graf et al., 1984). Donde “m” es la frecuencia basal para cada tipo de mancha, siendo “m= 2” para manchas simples, chicas y las manchas totales; en ambos casos se requiere duplicar la frecuencia basal para obtener un resultado significativo y “m= 5” para manchas grandes y gemelas; como estos eventos tienen una frecuencia basal baja, es necesario incrementar cinco veces la basal para obtener un resultado significativo (Frei y Wügler, 1988, 1995).

La comparación del total de manchas en los lotes experimentales con respecto al testigo puede arrojar los siguientes resultados: positivo, débil positivo, indeterminado o negativo.

Las siguientes 4 decisiones son posibles:

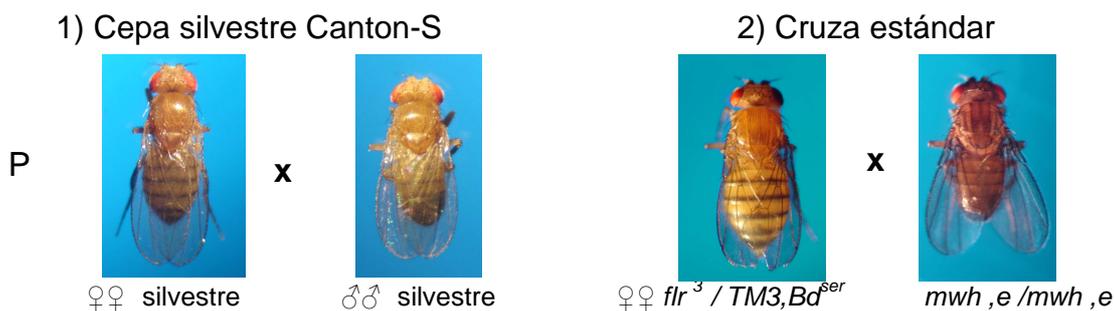
1. Aceptar la  $H_0$  y rechazar  $H_a$  = negativo
2. Rechazar  $H_0$  y aceptar  $H_a$  = positivo
3. Rechazar  $H_0$  y rechazar  $H_a$  = débil positivo
4. Aceptar la  $H_0$  y aceptar  $H_a$  = indeterminado

Para determinar la frecuencia de mutación y recombinación somática, las manchas se clasificaron por su tamaño en: chicas (1 – 2 células), grandes (> 2 células) y por su fenotipo en: simples y gemelas.

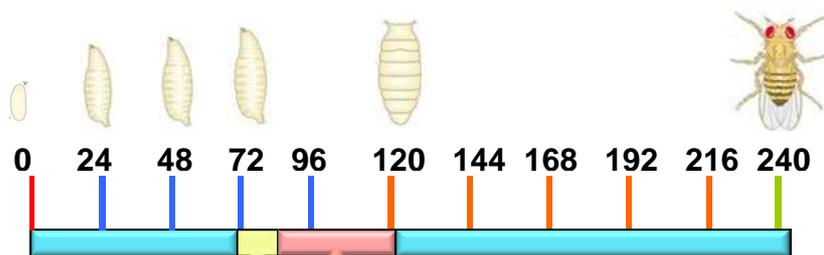
Las manchas recobradas se analizan cualitativamente y se obtiene la distribución del tamaño de mancha, que se compara con la distribución de de las moscas testigo para obtener así la distribución del tamaño de mancha inducida en las moscas tratadas. La distribución del tamaño de mancha permite estimar el número de divisiones celulares que se necesitan para formar esas manchas y por consecuencia, establece el tiempo en el que se originó la mancha durante el desarrollo de la mosca (Ramos *et al*, 2000) en ausencia de retraso o muerte celular (Figura 10).

El número de manchas por mosca permite estimar la diferente susceptibilidad de los individuos en una población, es decir cuando organismos similares genéticamente son expuestos a un compuesto, parte de la población muestra mayor evidencia del daño ocasionado por el compuesto, mientras que otra parte de la población puede llegar a mostrar poco o ningún daño (Ramos *et al*, 2000).

## CRUZA PROGENITORA



## SINCRONIZACIÓN



Tratamiento agudo 6hrs.  
(Primera etapa)

## TRATAMIENTO

Tratamiento subcrónico  
42 hrs (Segunda etapa)

Sacarosa 5%  
o NDMN  
5mM

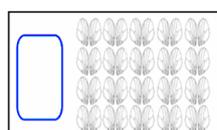


## FIJACIÓN

Se obtuvo IS y Psex (TOXICIDAD)

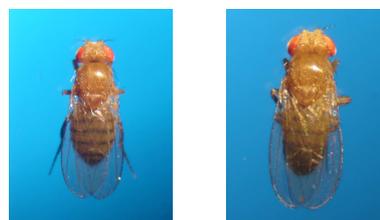
Protocolo SMART

Ceba silvestre



$flr^3$        $mwh$

Análisis con el programa  
de cómputo SMART



Progenie  $flr^3 / mwh, e$   
(libres de inversión)

Efecto genotóxico ó protector  
Biometrix® A-OX®

Figura 9. Resumen de la metodología utilizada en el presente trabajo.

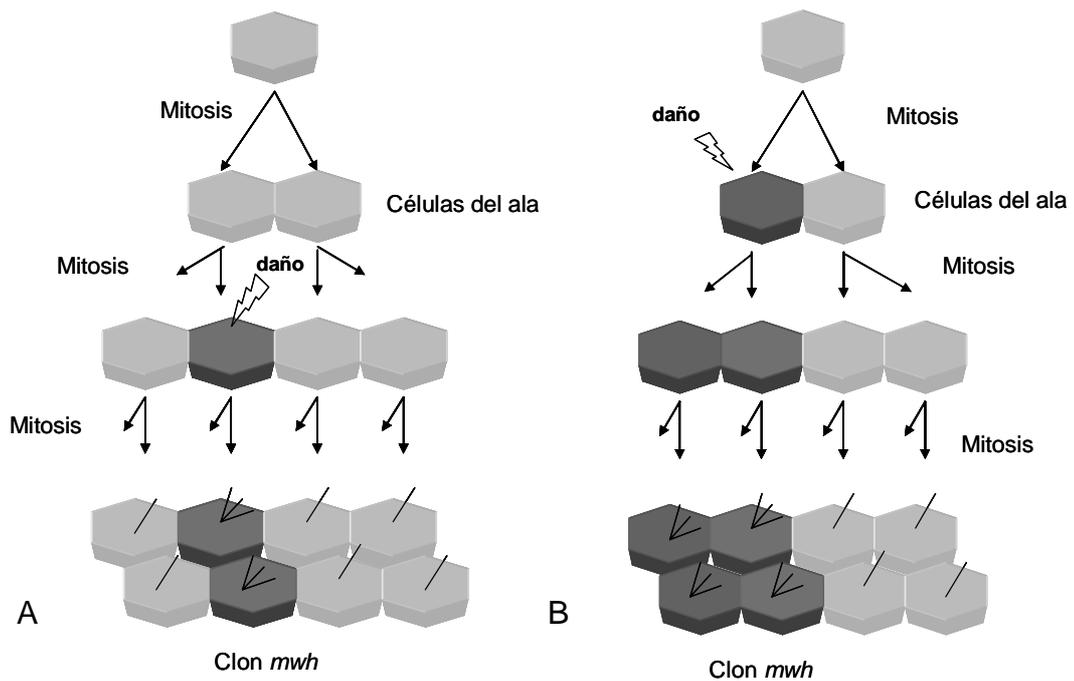


Figura 10. A. Mancha chica producida en etapa tardía. B Mancha grande producida en etapa temprana, en el desarrollo de *Drosophila melanogaster*.

## 6. RESULTADOS

### 6.1 Índice de sobrevivencia y proporción de sexos

El índice de sobrevivencia (IS) muestra la cantidad de organismos que se recobran en las diferentes concentraciones del compuesto a probar con respecto al testigo concurrente.

En la tabla I se muestra el (IS) y la proporción sexual (Psex) de moscas de tipo silvestre (C-S), libres de inversión (LI) y portadoras de inversión (PI) obtenidas del tratamiento sacarosa más BX. Para la línea testigo se encontraron diferencias significativas en los IS en las concentraciones 1.25, 40 y 80 % (ANOVA de dos vías  $p < 0.05$ , postest Bonferroni  $F_{(2)(12)} = 0.58$ ). Para las moscas LI se observaron diferencias significativas entre los IS de las concentraciones 0.625, 10, 40 y 80%. En las moscas PI el número de organismos recuperados en las concentraciones 0.625, 1.25, 20, 40 y 80% fue menor que el recobrado en el testigo (ANOVA de dos vías  $p < 0.05$ , postest Bonferroni  $F = 0.58$ ). También se confirmaron diferencias significativas entre las moscas libres de inversión (LI) y portadoras de inversión (PI) con respecto al testigo (C-S) en las concentraciones de 0.625, 10, 40 y 80% para las LI y 0.625, 1.25, 10, 20, 40 y 80% para las PI. En la figura 11 se muestra el IS (promedio  $\pm$  error estándar) para las moscas CS, LI y PI.

Para determinar si el tratamiento afectó particularmente a uno de los sexos se comparó la proporción de machos que se obtuvieron en el tratamiento con respecto a los testigos correspondientes de cada línea de moscas (CS, LI y PI) del tratamiento sacarosa más BX. Se observó que en las concentraciones de 40 y 80 % se encontraron diferencias significativas de las líneas de moscas LI y PI con respecto a su testigo (ANOVA  $p < 0.05$   $F_{(6)(12)} = 1.058$ ) (Figura 12).

Para el índice de sobrevivencia del tratamiento NDMA más BX se encontraron diferencias significativas (ANOVA de dos vías  $p < 0.05$ , postest Bonferroni  $F_{(2)(24)} = 1.43$ ) en la concentración 80% para las moscas CS y para las moscas LI se observó una menor cantidad de organismos recuperados en las concentraciones de 1.25 y de 20 a 80% las cuales mostraron diferencias significativas (ANOVA de dos vías  $p < 0.05$ ,  $F_{(2)(24)} = 1.43$ ) Tabla II y Figura 13.

Para la línea PI se observó que hay diferencias significativas en las concentraciones 0.625, 1.25, 20, 40 y 80 % (ANOVA de dos vías  $p < 0.05$  postest Bonferroni  $F_{(5)(24)} = 3.53$ ). Tabla II y Figura. 13.

En la tabla II se muestra la proporción de machos recuperados del tratamiento NDMA más el compuesto BX; aquí se encontraron diferencias significativas en la proporción de machos, en concentraciones de 80% para las moscas LI y PI (ANOVA  $p < 0.05$   $F_{(6)(12)} = 1.058$ ). Figura 14.

Tabla I. Índices de Supervivencia (IS) y Proporción de machos (Psex) de moscas expuestas al tratamiento Sacarosa + BX (promedio  $\pm$  error estándar, ee).

B. A-OX [%]	C-S				LI				PI			
	N	IS	$\pm$ ee	Psex $\pm$ ee	N	IS	$\pm$ ee	Psex $\pm$ ee	N	IS	$\pm$ ee	Psex $\pm$ ee
<b>Sac 5%</b>	166	1.00	$\pm$ 0.00	0.50 $\pm$ 0.08	104	1.00	$\pm$ 0.00	0.56 $\pm$ 0.03	107	1.00	$\pm$ 0.00	0.50 $\pm$ 0.05
<b>0.625</b>	102	0.62	$\pm$ 0.51	0.24 $\pm$ 0.24	44	0.46	$\pm$ 0.37*	0.25 $\pm$ 0.20	38	0.48	$\pm$ 0.39*	0.22 $\pm$ 0.32
<b>1.25</b>	80	0.49	$\pm$ 0.40*	0.31 $\pm$ 0.31	62	0.63	$\pm$ 0.51	0.25 $\pm$ 0.20	25	0.31	$\pm$ 0.26*	0.24 $\pm$ 0.34
<b>2.50</b>	163	0.98	$\pm$ 0.09	0.50 $\pm$ 0.01	72	0.69	$\pm$ 0.06	0.52 $\pm$ 0.05	100	0.97	$\pm$ 0.15	0.49 $\pm$ 0.02
<b>5.00</b>	140	0.84	$\pm$ 0.12	0.44 $\pm$ 0.01	89	0.88	$\pm$ 0.27	0.55 $\pm$ 0.05	76	0.78	$\pm$ 0.27	0.42 $\pm$ 0.02
<b>10.00</b>	146	0.88	$\pm$ 0.44	0.52 $\pm$ 0.01	45	0.51	$\pm$ 0.11*	0.33 $\pm$ 0.07	51	0.52	$\pm$ 0.18	0.57 $\pm$ 0.04
<b>20.00</b>	97	0.58	$\pm$ 0.03	0.49 $\pm$ 0.11	64	0.62	$\pm$ 0.09	0.44 $\pm$ 0.04	21	0.22	$\pm$ 0.08*	0.28 $\pm$ 0.28
<b>40.00</b>	66	0.40	$\pm$ 0.11*	0.50 $\pm$ 0.12	4	0.08	$\pm$ 0.08*	0.00 $\pm$ 0.00*	3	0.04	$\pm$ 0.04*	0.00 $\pm$ 0.00*
<b>80.00</b>	22	0.13	$\pm$ 0.09*	0.74 $\pm$ 0.26	2	0.02	$\pm$ 0.02*	0.00 $\pm$ 0.00*	4	0.05	$\pm$ 0.05*	0.00 $\pm$ 0.00*

C-S (moscas Canton – S); LI (moscas Libres de Inversión); PI (moscas Portadoras de inversión). \* Valores significativos con respecto al testigo (ANOVA;  $P < 0.05$ ).

Tabla II. Índices de Supervivencia (IS) y Proporción de machos (Psex) de moscas expuestas al tratamiento MDMA + BX (promedio  $\pm$  error estándar, ee).

B. A-OX [%]	C-S				LI				PI			
	N	IS	$\pm$ ee	Psex $\pm$ ee	N	IS	$\pm$ ee	Psex $\pm$ ee	N	IS	$\pm$ ee	Psex $\pm$ ee
<b>NDMA 5mM</b>	138	1.00	$\pm$ 0.00	0.50 $\pm$ 0.03	114	1.00	$\pm$ 0.00	0.53 $\pm$ 0.06	119	1.00	$\pm$ 0.00	0.48 $\pm$ 0.05
<b>0.625</b>	97	0.62	$\pm$ 0.51	0.26 $\pm$ 0.37	40	0.74	$\pm$ 0.60	0.23 $\pm$ 0.18	5	0.08	$\pm$ 0.07*	0.40 $\pm$ 0.40
<b>1.25</b>	108	0.69	$\pm$ 0.57	0.26 $\pm$ 0.37	41	0.39	$\pm$ 0.32*	0.23 $\pm$ 0.19	24	0.40	$\pm$ 0.33*	0.27 $\pm$ 0.38
<b>2.50</b>	111	0.77	$\pm$ 0.28	0.49 $\pm$ 0.04	78	0.69	$\pm$ 0.03	0.50 $\pm$ 0.04	86	0.97	$\pm$ 0.50	0.47 $\pm$ 0.02
<b>5.00</b>	84	0.61	$\pm$ 0.02	0.58 $\pm$ 0.01	67	0.56	$\pm$ 0.06	0.46 $\pm$ 0.07	69	0.53	$\pm$ 0.10	0.60 $\pm$ 0.01
<b>10.00</b>	133	0.99	$\pm$ 0.24	0.54 $\pm$ 0.08	43	0.42	$\pm$ 0.11*	0.47 $\pm$ 0.11	50	0.54	$\pm$ 0.23	0.52 $\pm$ 0.04
<b>20.00</b>	87	0.62	$\pm$ 0.12	0.44 $\pm$ 0.04	48	0.31	$\pm$ 0.19*	0.52 $\pm$ 0.02	30	0.26	$\pm$ 0.01*	0.36 $\pm$ 0.14
<b>40.00</b>	77	0.60	$\pm$ 0.29	0.57 $\pm$ 0.02	4	0.38	$\pm$ 0.29*	0.46 $\pm$ 0.04	10	0.06	$\pm$ 0.06*	0.30 $\pm$ 0.30
<b>80.00</b>	14	0.12	$\pm$ 0.12*	0.29 $\pm$ 0.29	1	0.01	$\pm$ 0.01*	0.00 $\pm$ 0.00*	0	0.00	$\pm$ 0.00*	0.00 $\pm$ 0.00*

C-S (moscas Canton – S); LI (moscas Libres de Inversión); PI (moscas Portadoras de inversión). \* Valores significativos con respecto al testigo (ANOVA;  $P < 0.05$ ).

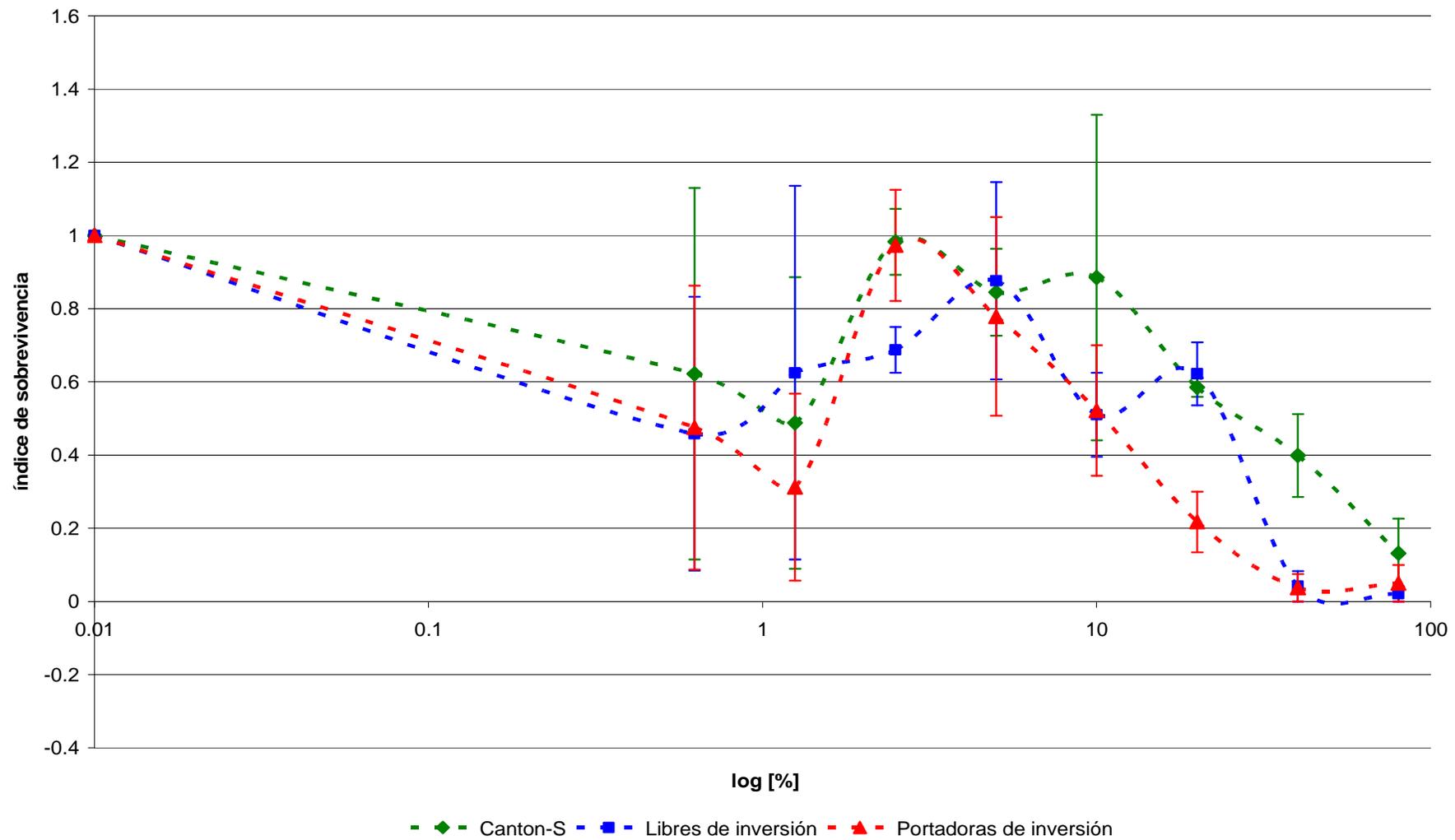


Figura 11. Índice de sobrevivencia del tratamiento Sacarosa + BX en función del logaritmo de la concentración.

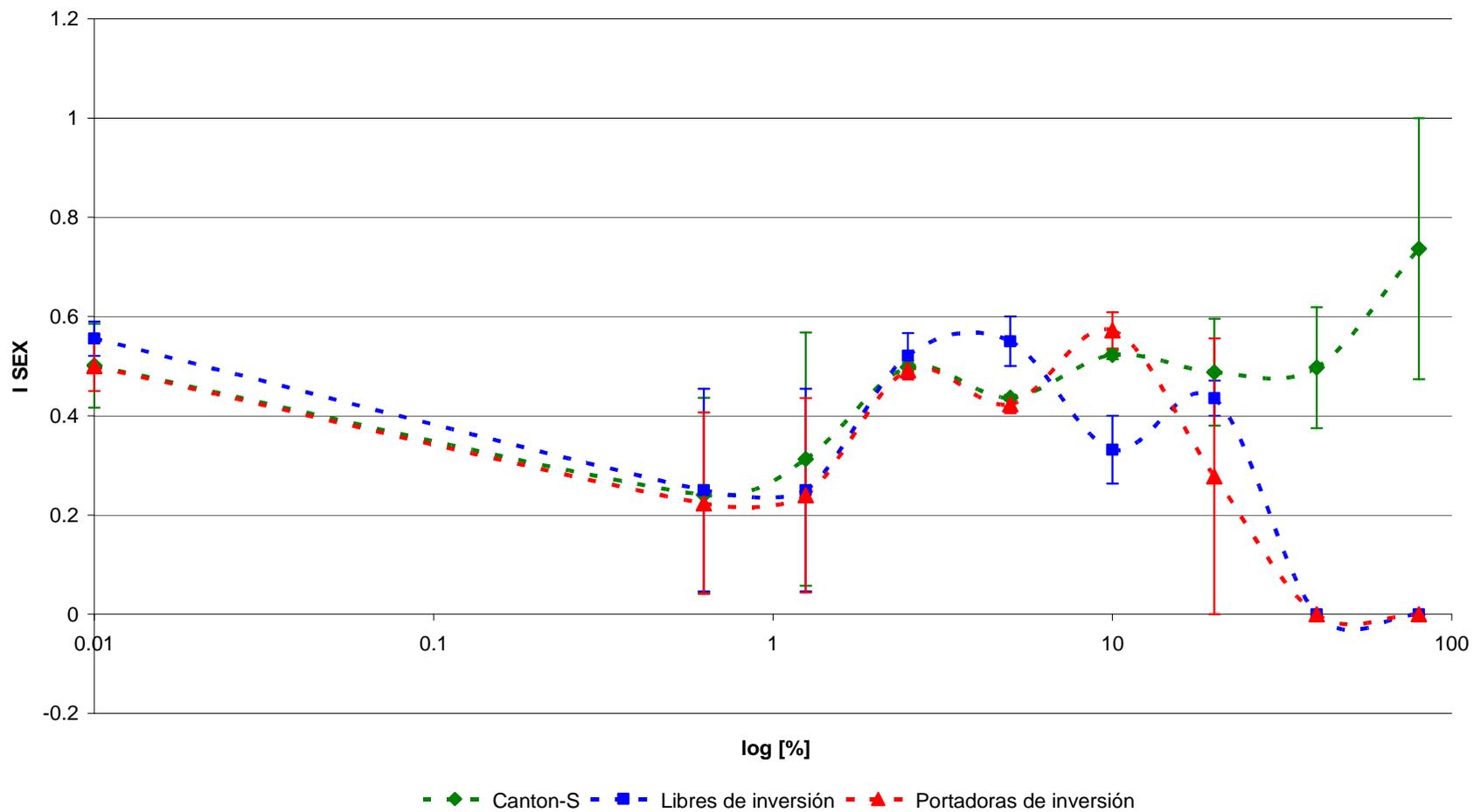


Figura 12. Proporción sexual de machos del tratamiento Sacarosa + BX en función del logaritmo de la concentración.

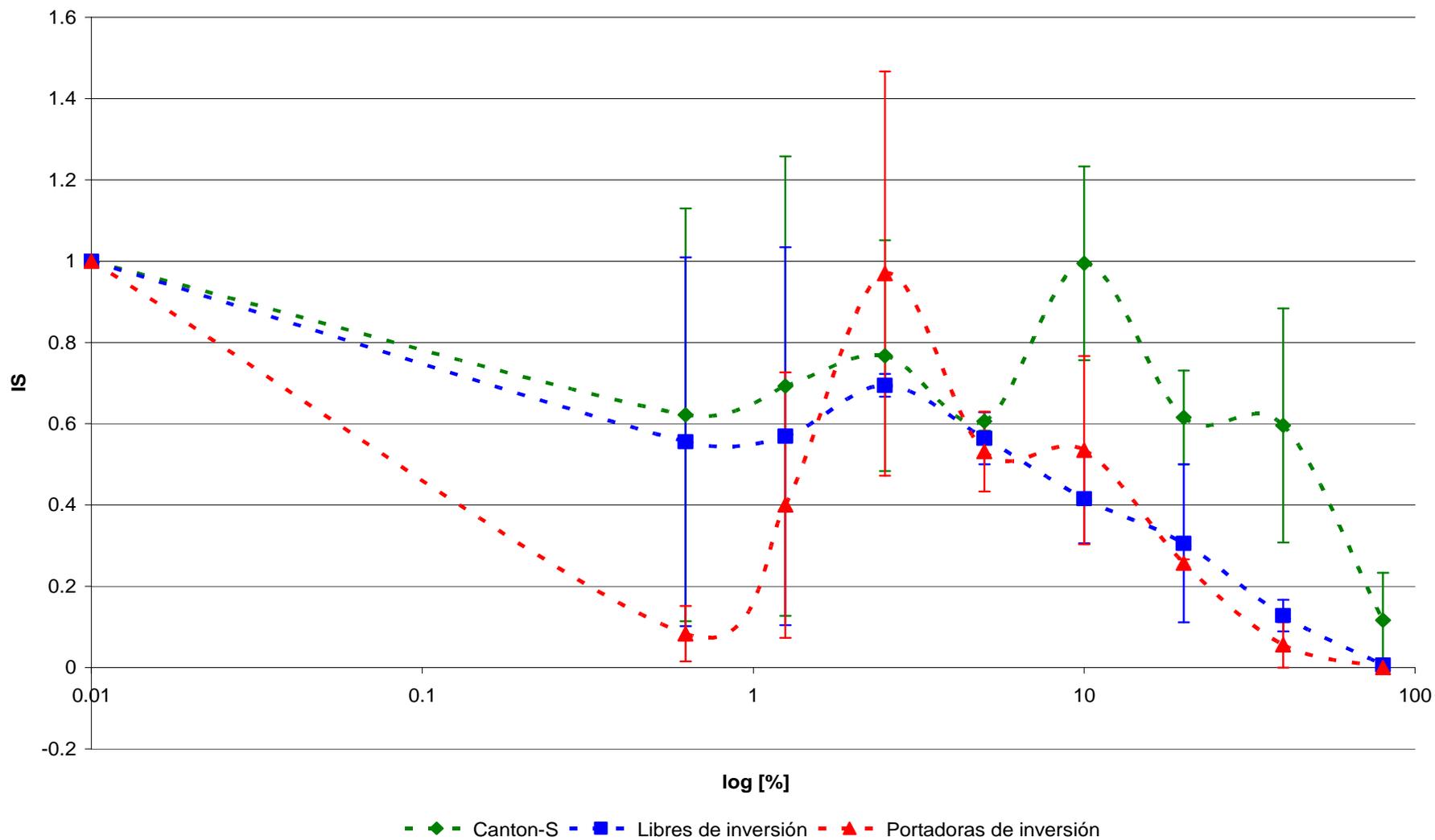


Figura 13. Índice de sobrevivencia del tratamiento NDMA + BX en función del logaritmo de la concentración.

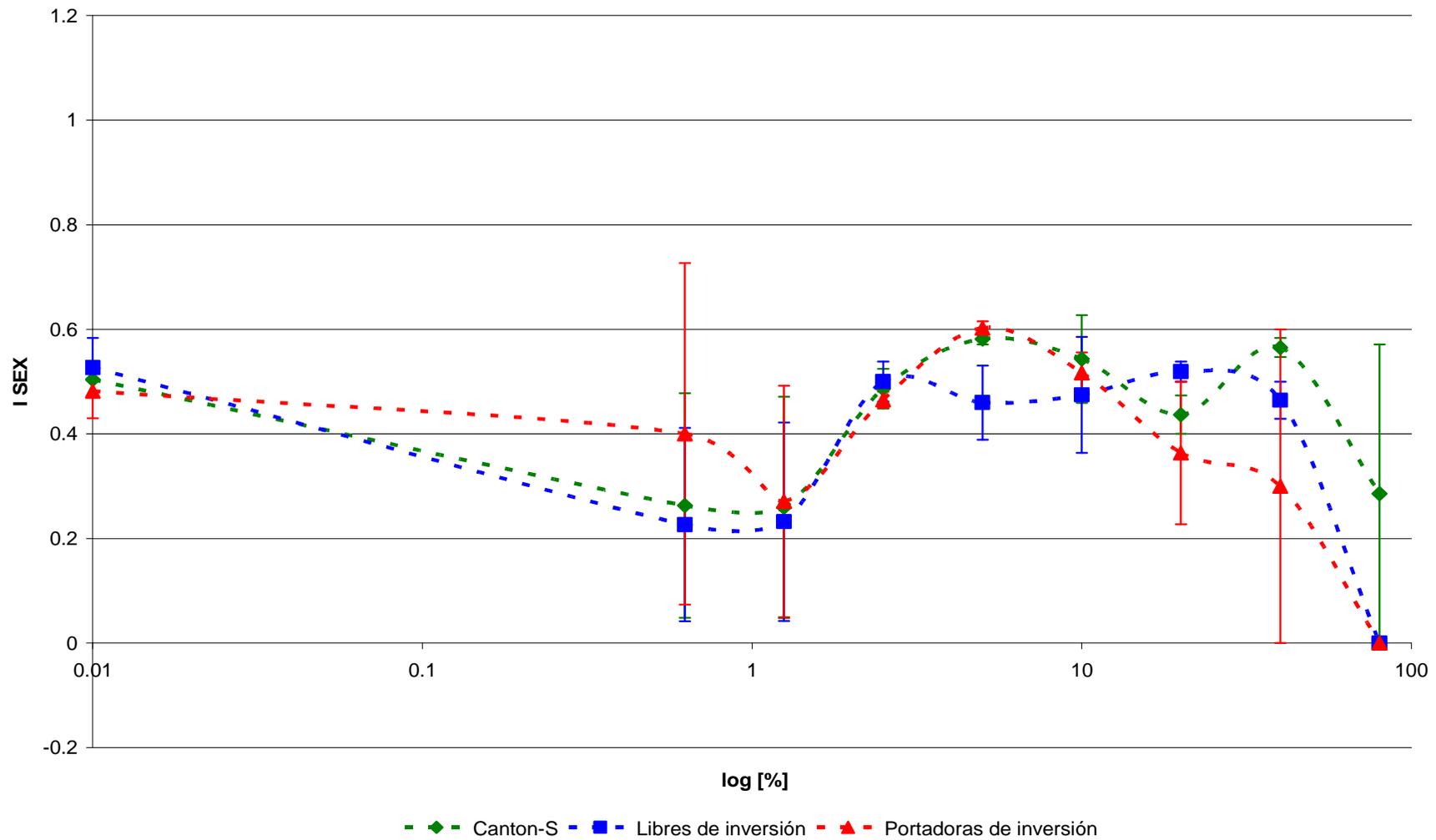


Figura 14. Proporción sexual de machos del tratamiento NDMA + BX en función del logaritmo de la concentración.

## 6.2 Resultados de genotoxicidad de Biometrix

En la figura 15 se muestra la frecuencia del testigo positivo (NDMA) como el negativo (Sacarosa).

En cuanto a la frecuencia de manchas del tratamiento sacarosa más BX se obtuvo un resultado positivo en la frecuencia de manchas grandes y totales en la concentración de 5 y 40 %. Figura 16, Tabla III.

Tabla III. Resultados obtenidos en la prueba SMART. Tratamiento Sacarosa + BX.

B. A-OX [%]	No de Alas	Manchas chicas (1-2 cél) m=2		Manchas grandes (> 2 cél) m=5		Manchas gemelas m=5		Totales	
		Frec.	D	Frec.	D	Frec.	D	Frec.	D
<b>Sac5%</b>	142	0.22		0.01		----	---	0.23	
<b>0.625</b>	80	0.12	-	0.01	i	----	--	0.13	-
<b>1.25</b>	120	0.11	-	0.03	i	----	--	0.14	-
<b>2.5</b>	128	0.18	-	0.02	l	----	--	0.2	-
<b>5</b>	120	0.29	i	0.29	+	----	--	0.58	+
<b>10</b>	80	0.26	-	0.01	i	----	--	0.27	-
<b>20</b>	120	0.17	-	----	--	----	--	0.17	-
<b>40</b>	8	----		0.37	+	----	--	0.37	+
<b>80</b>	0	----	--	----	--	-----	--	----	---

D=Diagnostico acorde a Frei y Würigler Mutation Res., 203 (1988) 297-308.  
 +=positivo; -= negativo; i = inconcluso. m=factor múltiple, nivel de probabilidad:  $\alpha=0.05$

En cuanto a los datos de células por mancha en las concentraciones de 1.25, 2.5 y 10 % se encontraron manchas de mayor tamaño en comparación con el testigo. En la concentración de 40% sólo se obtuvieron manchas grandes. Figura 17.

En la Figura 18 se muestra la distribución de número de manchas por mosca, y se observa que hay moscas en el lote testigo que tienen de una a tres manchas esto también se puede observar en las concentraciones probadas pero con una mayor frecuencia en las concentraciones de 10, 20 y 40%. También se observó que hay un mayor número de moscas que no presentan manchas en todas las concentraciones, sin embargo en la concentración de 5 % hay moscas que tienen más de 20 manchas, obteniendo diferencias significativas por medio de una  $\chi^2 p < 0.05$ .

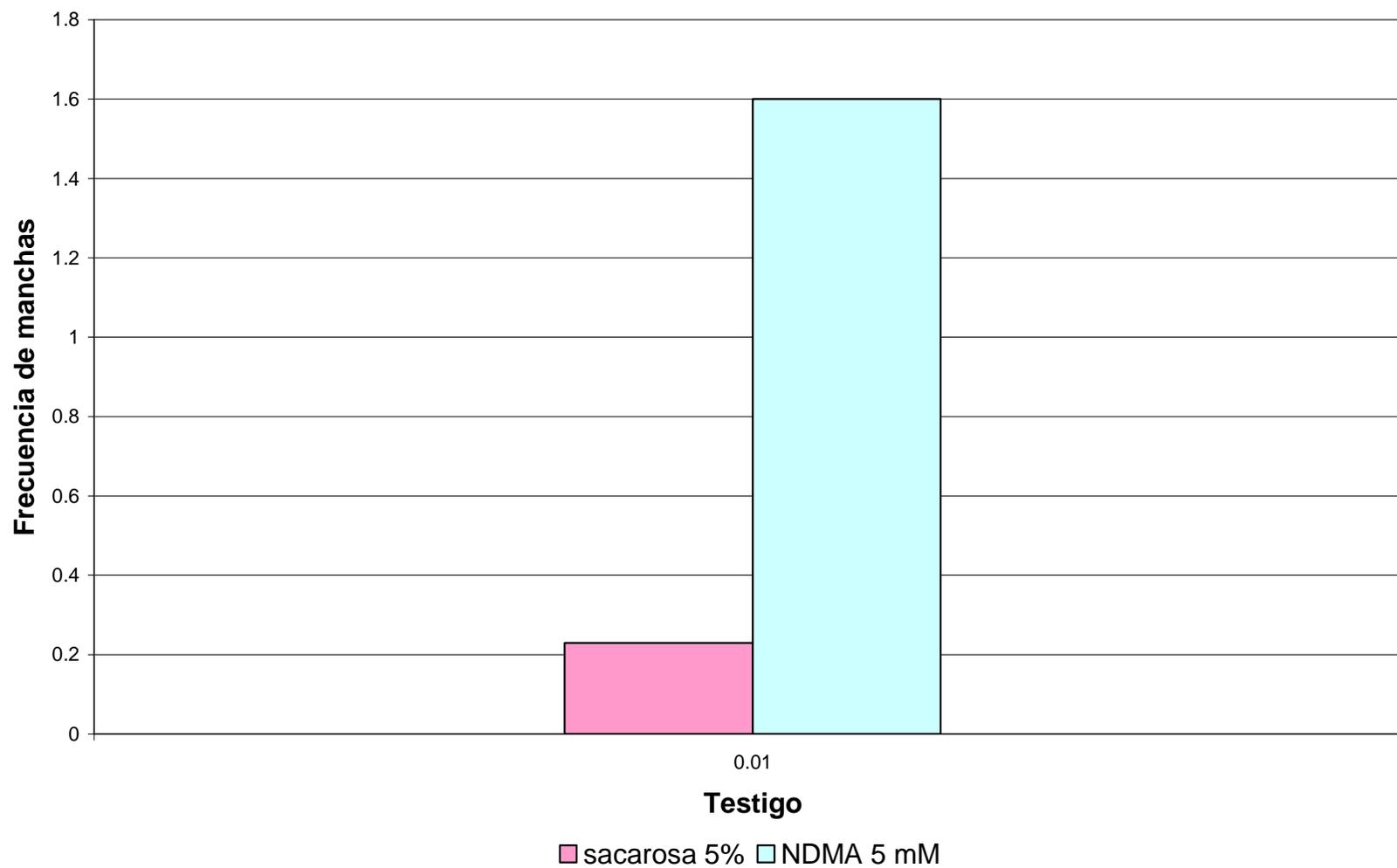


Figura 15. Frecuencia de manchas del testigo negativo (sacarosa) y positivo (NDMA).

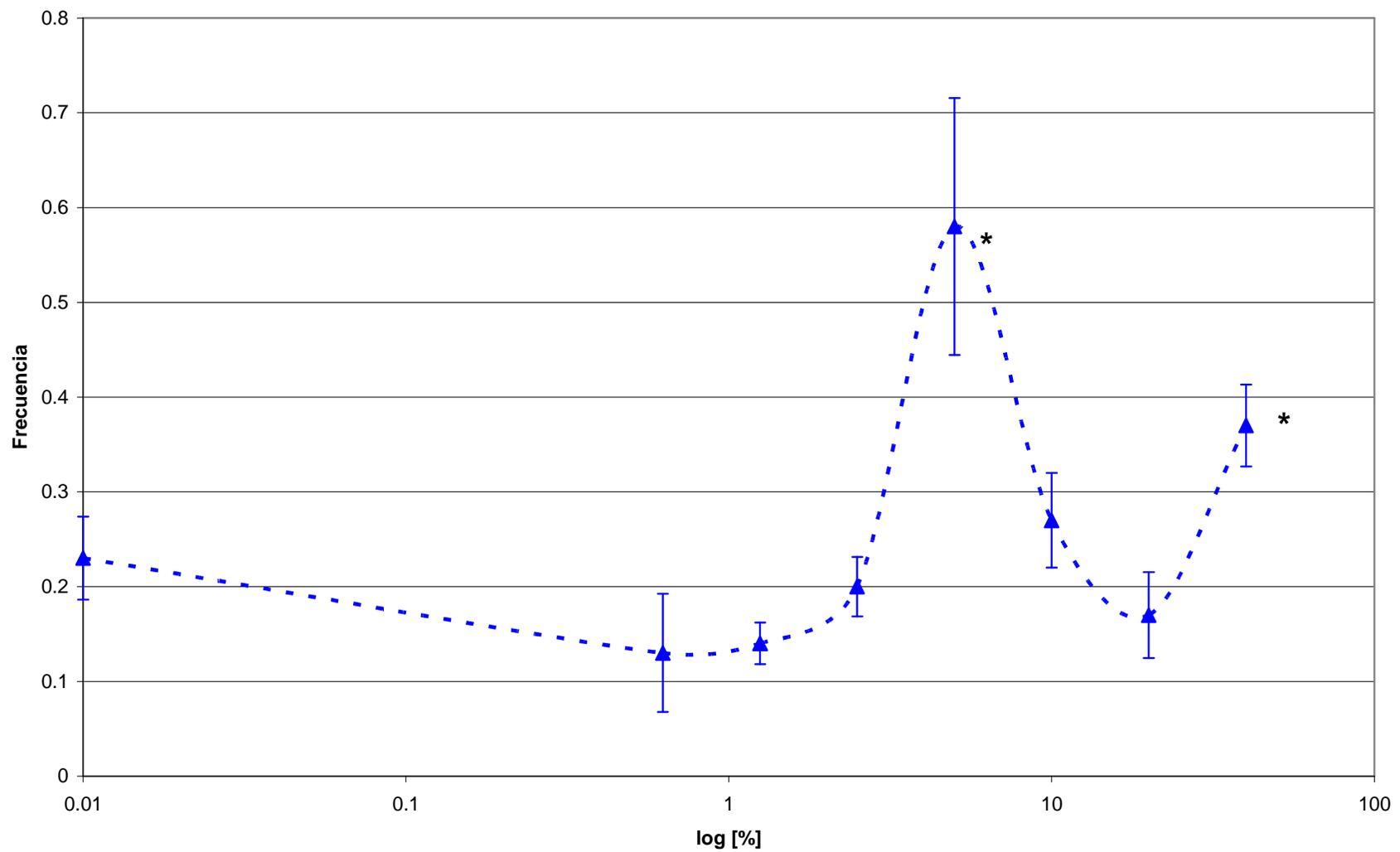


Figura 16. Frecuencia de manchas totales del tratamiento Sacarosa + BX.

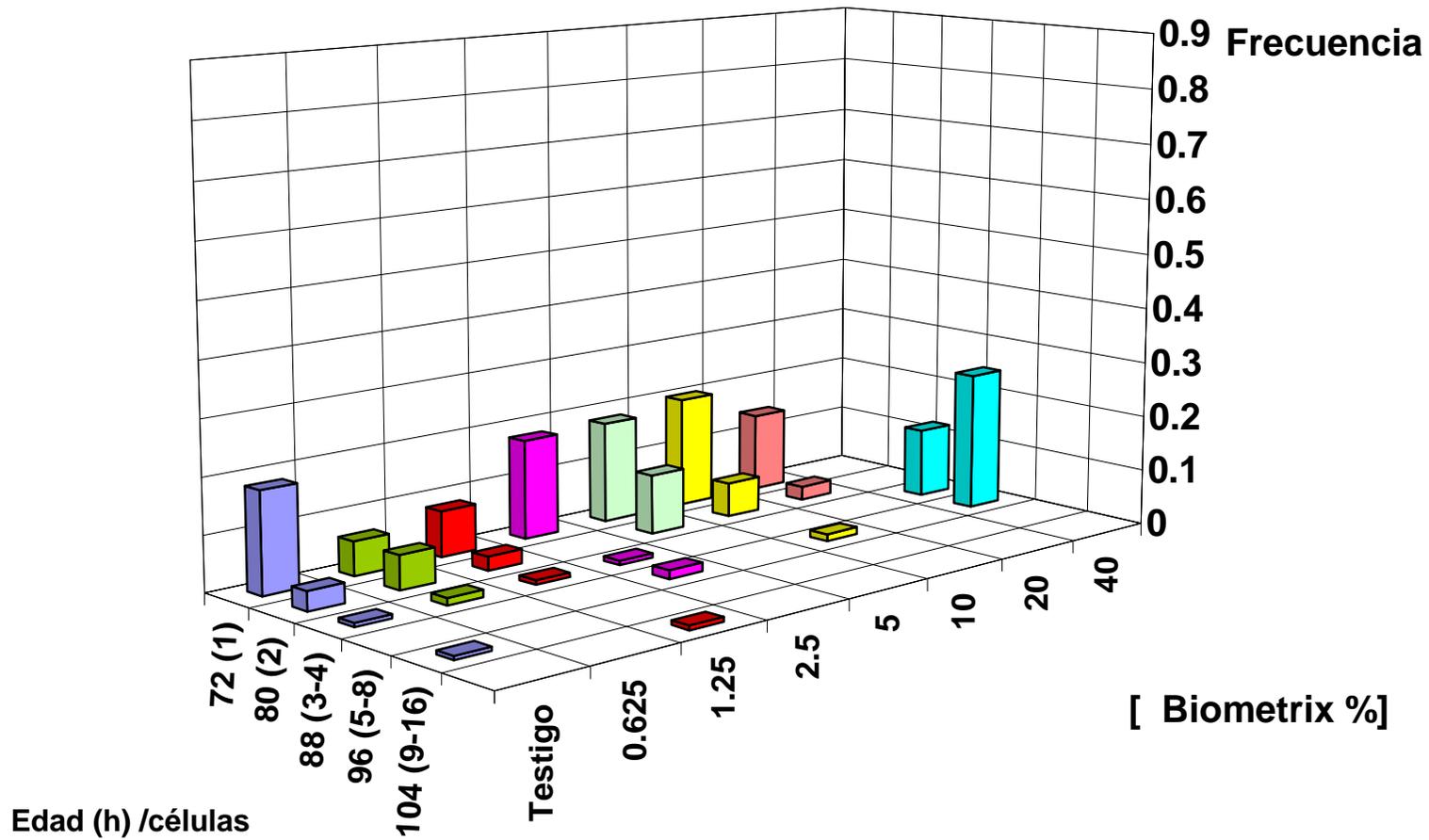


Figura 17 Número de células/mancha recobrado en el tratamiento Sacarosa + BX.



### 6.3 Resultados de actividad protectora

Para saber si el BX tiene actividad protectora se dio el tratamiento de NDMA mas el BX y se comparó la frecuencia de manchas totales en presencia y ausencia de BX. Los resultados se muestran en la Tabla VI y figura 19. En las concentraciones de 0.625 a 2.5 y de 20 y 40 % el incremento en la frecuencia de manchas fue significativo.

Tabla IV. Resultados obtenidos en la prueba SMART. Tratamiento NDMA + BX..

B. A-OX [%]	No de Alas	Manchas chicas (1 -2 cél) m=2		Manchas grandes (> 2 cél) m=5		Manchas gemelas m=5		Totales	
		Frec.	D	Frec.	D	Frec.	D	Frec.	D
<b>NDMA</b>	120	0.99		0.57		0.04		1.6	
<b>0.625</b>	80	1.44	w	1.21	w	0.12	+	2.77	+
<b>1.25</b>	82	1.52	w	1.61	w	0.28	+	3.41	+
<b>2.5</b>	122	1.5	w	1.12	w	0.08	i	2.7	+
<b>5</b>	122	0.98	-	0.78	w	---		1.76	-
<b>10</b>	80	0.64	+	0.79	w	0.03	i	1.46	-
<b>20</b>	94	0.53	+	0.38	w	0.01	i	0.92	+
<b>40</b>	8	---		0.37	+	---	--	0.37	+
<b>80</b>	0	---	--	---	--	---	--	----	---

D= Diagnostico acorde a Frei y Würzler Mutation Res., 203 (1988) 297-308.  
 +=positivo; -= negativo; i = inconcluso. m=factor múltiple, nivel de probabilidad:  $\alpha=0.05$

Para la distribución de células por mancha se encontró que en el grupo testigo la mayoría de las manchas encontradas son chicas, aunque también se encuentran manchas grandes pero en menor frecuencia que en el testigo. Para las concentraciones 0.625 a 2.5 % se encontró que la frecuencia de manchas chicas y grandes es mayor que en el testigo. A partir de la concentración 5 a 40 % la frecuencia de manchas chicas disminuyó en comparación con las de el testigo, sin embargo la distribución de la frecuencia de manchas grandes aumentó (Figura 20).

En la figura 21 se muestra los resultados de manchas por mosca. En las concentraciones 0.625 1.25 y 40% se recobraron moscas que no presentaron manchas. En las concentraciones 0.625 a 2.5%, la frecuencia de moscas con más manchas aumenta con respecto al testigo ( $\chi^2$  p< 0.05).

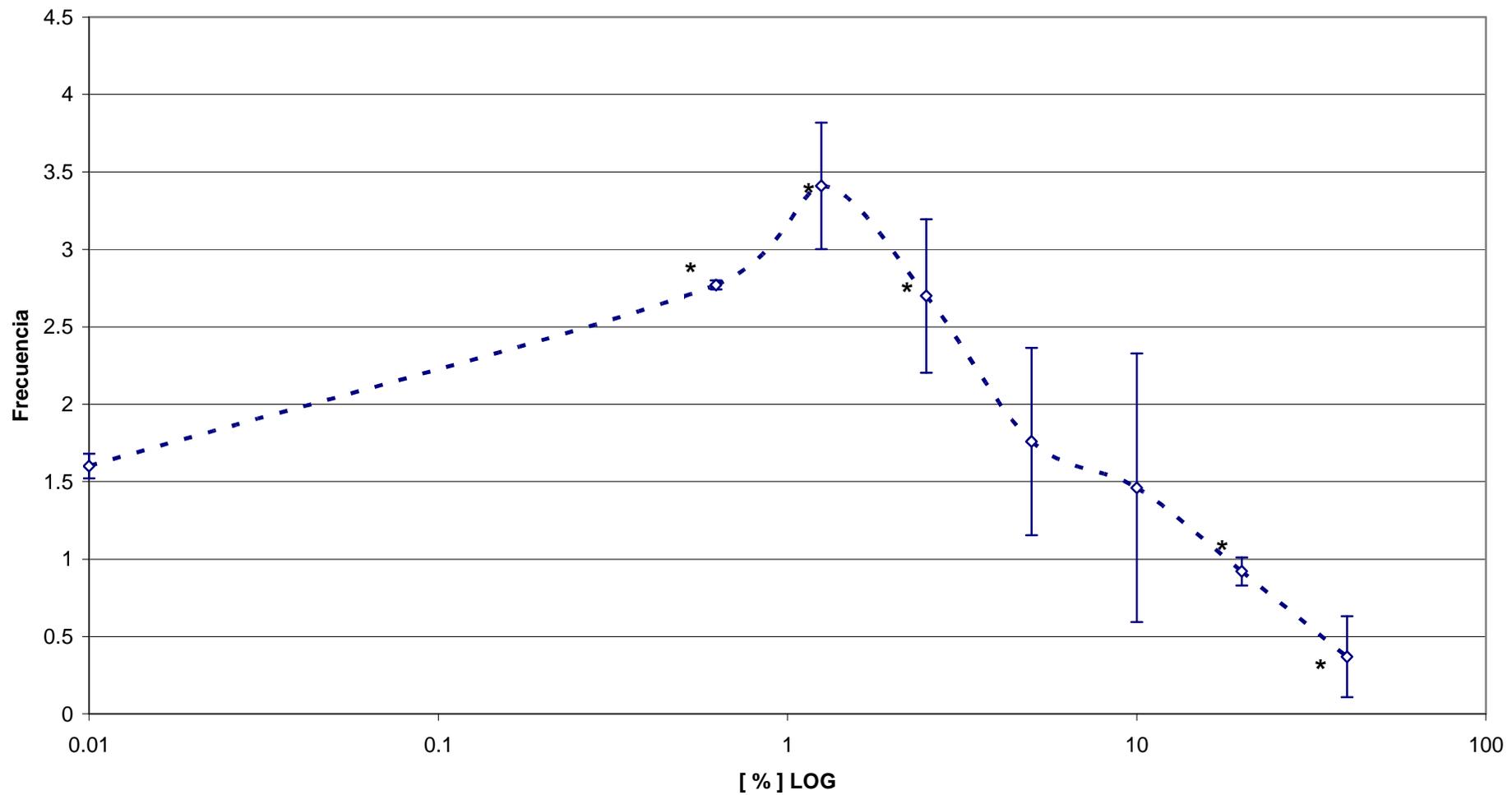


Figura 19. Frecuencia de manchas totales del tratamiento NDMA + BX.

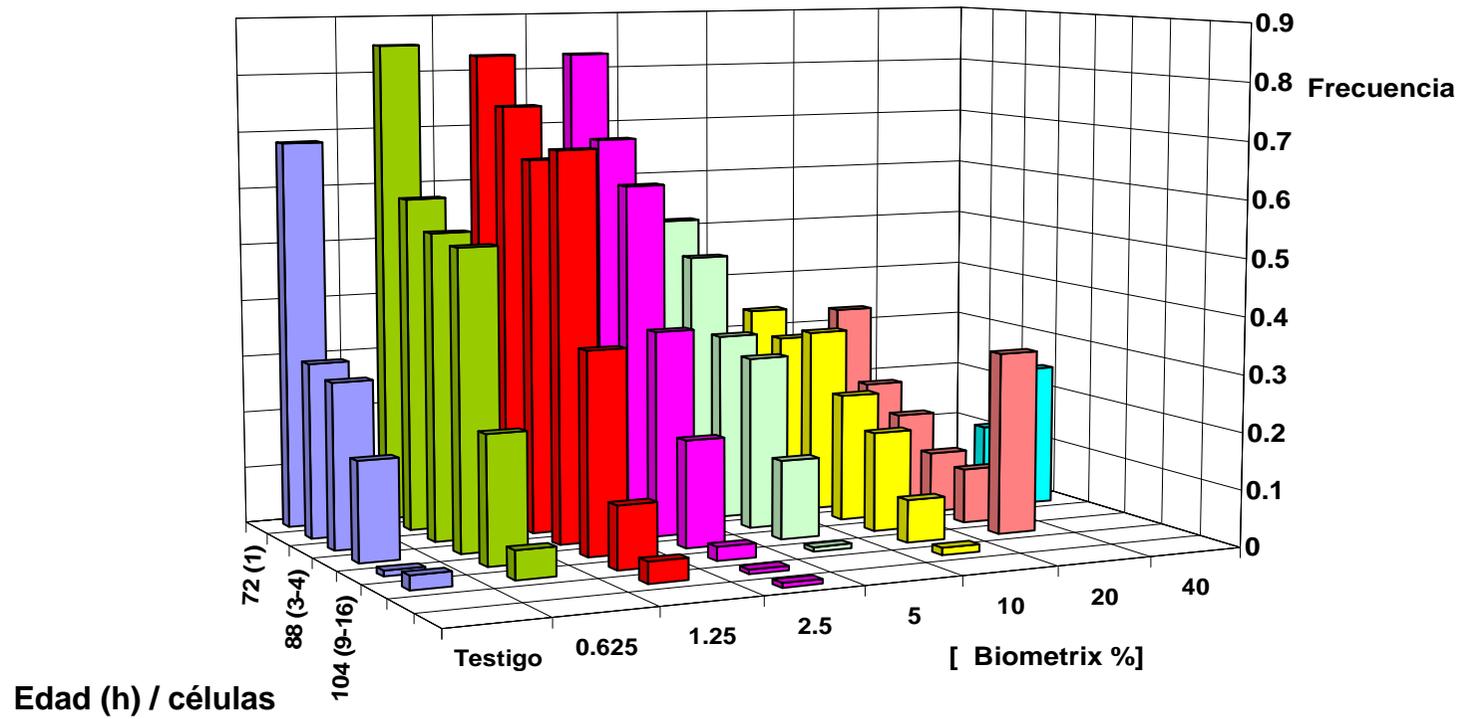


Figura 20. Número de células/mancha recobrado en el tratamiento NDMA + BX.

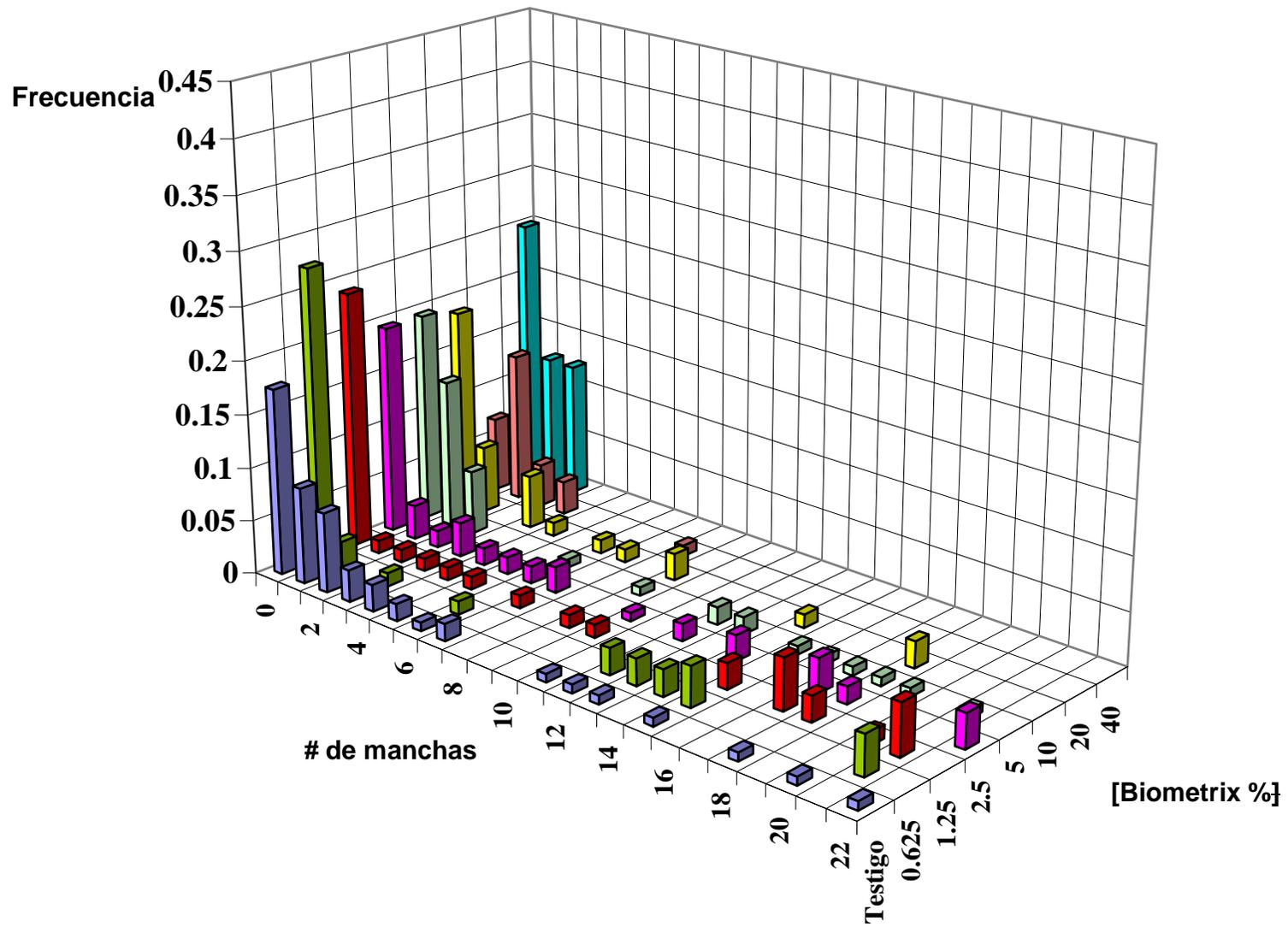


Figura 21. Frecuencia de manchas/mosca del tratamiento NDMA + BX.

## 7. DISCUSIÓN

Un problema grave en nuestros días, es la aparición de productos naturales como remedios herbolarios, suplementos alimenticios, entre otros que se caracterizan por señalar en su publicidad una o varias cualidades terapéuticas, preventivas o curativas, que van desde cuestiones estéticas hasta la solución de problemas graves de salud.

La publicidad de estos productos es engañosa ya que sugieren resultados casi milagrosos y se excusan en que la mayoría de estos productos son elaborados con sustancias de origen natural o son preparados con diversos nutrientes que el cuerpo necesita.

En el presente estudio se determinó la toxicidad de BX mediante el Índice de Supervivencia (IS), el cual muestra la proporción de organismos que sobreviven a un tratamiento. Con base en el IS obtenido se puede sugerir que el compuesto es tóxico ya que en las concentraciones más altas se recobró menor número de organismos con respecto a su testigo. Arellano (2002) sugirió que la respuesta tóxica en algunos casos y subtóxica en otros podría estar dada por la accesibilidad del compuesto o de la mezcla a los organismos tratados. Se ha reportado que en *Drosophila melanogaster* la vitamina E se metaboliza vía un mecanismo que involucra citocromo P450 tocoferol- $\omega$ -hidroxilasa, (Parker y McCormick, 2005; Karekar et al., 2000) y se ha probado los efectos antioxidantes de la vitamina C en el sistema *in vivo* de *Drosophila melanogaster* (Kaya et al., 2002; Graf et al., 1998), por lo que la mosca ha mostrado ser sensible al tratamiento aquí empleado.

Las moscas silvestres fueron empleadas para discriminar si el efecto obtenido se debe al tratamiento o a los marcadores genéticos utilizados para evaluar la inducción de mutación y recombinación somática y que pudieran alterar la respuesta de toxicidad obtenida. En presencia de BX se recuperó menor cantidad de organismos LI y PI con respecto al testigo; con base en esto se puede decir que las moscas LI y PI resultaron ser más afectadas que las moscas silvestres en las concentraciones mas altas, y que las diferencias en el

IS entre las líneas de moscas, podría estar determinada por su constitución genética, ya que al tener un arreglo genético diferente este podría intervenir en la expresión de otras funciones, como el de la modulación de la actividad metabólica (Clements et al,1988; García, 2006; Muñoz, 2007).

Al recuperarse menor número de organismos PI con respecto a las silvestres, sugiere que el BX podría inducir rompimientos de DNA que requieran repararse principalmente por recombinación, mecanismo para el que estas moscas resultan deficientes por la presencia del cromosoma balanceador.

La toxicidad presentada por BX para los tres tipos de mosca, se incrementó cuando se administró junto con la NDMA pero fueron más afectadas las moscas LI y PI. Se ha reportado que a una concentración de 50 mM de NDMA (Graf et al., 1984), mucho mayor de la aquí empleada se recobran organismos, lo que sugiere que parte del efecto tóxico observado puede asociarse al BX.

Con respecto a los componentes del BX se han reportado efectos tóxicos asociados con la vitamina E así como con la C. En un análisis que se publicó en 2004 en el cual se investigaron los efectos de suplementos alimenticios con características antioxidantes que incluían vitamina A, C y E sobre cáncer gastrointestinal, se encontró que éstos no disminuyeron el cáncer, por el contrario, su consumo se asoció con un incremento en la mortalidad (Bjelakovic et al., 2004). En un ensayo clínico llevado a cabo durante siete años, en el que pacientes recibieron suplementación con vitamina E y se calculaba la incidencia de cáncer y muerte por cáncer, se concluyó que en pacientes con enfermedad vascular o diabetes mellitus, la suplementación con vitamina E no previno el cáncer, sin embargo, se observó incremento en el riesgo de insuficiencia cardíaca y en altas dosis de vitamina E, mayor riesgo de mortalidad (Boskovic et al., 2005; Blé et al., 2007; Gabbianelli, 2004); también toxicidad hemorrágica en ratas y pollos (Takahashi, 1994). También se ha reportado que el extracto de *Panax ginseng* administrado en altas dosis, presenta toxicidad en ratas (Kitts y Hu, 2009).

Para determinar si el BX afectó en lo particular a uno de los sexos se obtuvo la proporción sexual (PSx). No se observaron diferencias entre sexos. Aunque en las concentraciones mayores se observó que la proporción de machos de las líneas LI y PI es menor, no obstante el bajo número de organismos recobrados hace poco confiable esta observación. Lo anterior no se modificó en el tratamiento NDMA más el compuesto BX.

El efecto genotóxico de BX se evaluó a través de la prueba de mutación y recombinación somática (SMART), la cual registra la ocurrencia probable de un amplio espectro de cambios genéticos, como mutación puntual, delección, algunos tipos de aberraciones cromosómicas, recombinación mitótica y conversión génica (Patenkovic et al., 2008).

El BX aumentó la frecuencia de manchas, con respecto al testigo, obteniéndose una respuesta genotóxica del compuesto. Al no encontrarse manchas gemelas se podría decir que las mutaciones que originan las manchas recobradas, están relacionadas con eventos de mutación puntual, delección y no disyunción, aunque también es probable que las manchas sencillas se originen por eventos de recombinación entre los marcadores *mwh* y *flr*<sup>3</sup>.

El análisis de la distribución de células por manchas y el de la distribución del número de manchas por mosca, aportan información indirecta acerca del tiempo probable en el que se indujo el daño y ayudan a descartar los posibles falsos positivos y negativos que pudieran influir en los resultados. De los resultados obtenidos de las células por mancha y manchas por mosca del tratamiento con BX, es posible que en los organismos, en los que se encontró un tamaño de mancha grande, el daño haya ocurrido al inicio del desarrollo del ala. Una mancha grande es evidencia de que después de la inducción de la lesión ésta se reparó y la célula afectada mantuvo la capacidad de proliferar mitóticamente, mientras que, las manchas chicas sugieren que el daño ocurrió al final del desarrollo; siempre y cuando no se presente muerte celular.

En el tratamiento no se observó relación entre el tamaño de la mancha registrada y la concentración. Dorantes (2000) y Ramos et al. (2000), sugieren que parte del daño genotóxico podría no ser evidenciado, ya que podría provocar la pérdida de la célula afectada. La ausencia de células afectadas podría asociarse con la aparente falta de efecto del BX lo que llevaría a una conclusión falsa, ya que el BX podría acentuar el efecto provocar citotoxicidad. Se ha reportado que la vitamina E, que es uno de los principales componentes de BX, tiene un efecto citotóxico en ratón ya que afecta la viabilidad de los macrófagos (Parker y McCormick, 2004).

En *Drosophila melanogaster* el estadio larvario facilita la evaluación de más de un tipo de exposición, como tratamientos agudos, crónicos o combinados, permitiendo realizar estudios de antigenotoxicidad. Para poder evaluar el efecto protector se tuvo que inducir daño, y este se produjo con la NDMA, la cual se ha reportado que tiene efectos genotóxicos en *Drosophila melanogaster*. (Graf et al., 1984) Al poder evaluar más de un compuesto se puede medir si estos presentan un efecto sinérgico (la combinación de dos sustancias es mucho mayor del efecto de cada una por separado), potenciador (cuando una sustancia que carece de un efecto y al ser añadido otro agente hace que este último resulte mucho más tóxico) o aditivo (la combinación de dos sustancias químicas es igual a la suma de los efectos de cada una de ellas por separado) (Klaassen y Watkins, 2005).

En el tratamiento se observó efecto potenciador del BX ante el daño inducido de la NDMA ya que la frecuencia de manchas del testigo positivo (NDMA), aumento de manera significativa con el compuesto BX esto en concentraciones bajas, aunque en las concentraciones altas la frecuencia de manchas recobradas fue menor. Esto podría indicar dos opciones: la primera es que el BX protege y reduce parte del daño inducido por la NDMA; y la segunda es que BX acentúa el efecto genotóxico de NDMA, lo que conduciría a la pérdida de las células dañadas, provocando que la frecuencia de eventos somáticos sea menor.

Al observar la distribución de células por mancha, la frecuencia de manchas por mosca y el índice de sobrevivencia, se sugiere que BX no tiene un efecto protector, por el contrario, acentúa el efecto genotóxico de la NDMA, ya que al recuperar pocos organismos del tratamiento y observar en menor proporción las manchas chicas y el aumento en la frecuencia de manchas grandes, se puede decir que en realidad se está dando una respuesta enmascarada donde realmente se registra un efecto citotóxico y no protector.

Si bien los antioxidantes pueden proteger a la célula del daño producido por las ERO, como radicales superóxido, peróxido hidroxil y peroxinitritos, el desequilibrio entre los antioxidantes y las especies reactivas de oxígeno resulta en un estrés oxidativo que finalmente da lugar a daño celular (Orhan et al, 2009). Se ha reportado que la vitamina C actúa como un co-mutágeno promoviendo la generación de radicales oxígeno e induciendo intercambios de cromátidas hermanas en células cultivadas de mamíferos y otros tipos de daño genético (Kaya, 2002), además Kakevar, (2000) reportó que no encontró efecto antimutagénico de la vitamina E ante el daño inducido por la aflatoxina. También se ha reportado en piel de ratón que la vitamina E es un promotor de tumor (McCall y Frej, 1999; Yamashita et al., 1998; Schwartz, 1996).

Se recomienda realizar estudios dirigidos para evaluar la actividad de BX como atrapador de radicales libres y para confirmar o rechazar el efecto citotóxico observado en este trabajo. Es importante seguir realizando estudios enfocados a evaluar productos que se venden sin preinscripción médica ya que por ser de origen natural se asume que no causan daño alguno a la población humana.

## 8. CONCLUSIONES

- El tratamiento con Biometrix<sup>®</sup> A-OX<sup>®</sup> afectó significativamente la sobrevivencia de los organismos.
- Biometrix incrementó la frecuencia de mutación y recombinación somática es decir resultó ser genotóxico en el sistema *in vivo* de *Drosophila melanogaster*.
- Biometrix<sup>®</sup> A-OX<sup>®</sup> incrementó la frecuencia de mutación somática de la NDMA en bajas concentraciones.
- Biometrix<sup>®</sup> A-OX<sup>®</sup> no disminuyó la frecuencia de daño genotóxico de la NDMA, su efecto podría ser citotóxico.

## BIBLIOGRAFÍA

Adams M. D., Celniker S.E., Holt R.A., Evans C.A., Gocayne J.D., Amanatides P.G., Scherer S.E., Li P.W., Hoskins R.A., Galle R.F., George R.A., Lewis S.E., Richards S., Ashburner M., Henderson S.N., Sutton G.G., Wortman J.R., Yandell M.D., Zhang Q., Chen L.X., Brandon R.C., Rogers Y.H.C., Blazej R.G., Champe M., Pfeiffer B.D., Wan K.H., Doyle C., Baxter E.G., Helt G., Nelson C.R., Gabor Miklos G.L., Abril J.F., Agbayani A., An H.J., Andrews-Pfannkoch C., Baldwin D., Ballew R.M., Basu A., Baxendale J., Bayraktaroglu L., Beasley E.M., Beeson K.Y., Benos P.V., Berman B.P., Bhandari D., Bolshakov S., Borkova D., Botchan M.R., Bouck J. y col. (2000). The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. **Science** 287: 2185-2195.

Amorós G. M. (2006). Estudio de mutantes del cromosoma III de *Drosophila melanogaster*: el gen ash-2 como regulador de diferenciación celular. Tesis de Doctorado. Facultad de Biología. Universidad de Barcelona. España. 165 pp.

Andreas C. G., David L.S. (2003). Precursors of N-Nitrosodimethylamine in Natural waters. **Environmental Science and Technology**. 37:1331-1336.

Arellano A. R. O. (2002). *Drosophila* como modelo *in vivo* para evaluar el potencial genotóxico de muestras ambientales. Los Azufres, Mich. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias. UNAM. México. 51 pp.

Baars A.J., Blijleven W.G.H., Mohn G.R., Natarajan A.T. y Breimer D.D. (1980). Preliminary studies on the ability of *Drosophila* microsomal preparations to activate mutagens and carcinogens. **Mutation Research**. 72: 257—264.

- Bate M y Martínez-Arias A. (1991). The embryonic origin of imaginal discs in *Drosophila*. **Development** 112: 755-761.
- Bjelakovic G., Nikolova R., Simonetti G. y Gluud C. (2008). Systematic review: primary and secondary prevention of gastrointestinal cancers with antioxidante supplements. **Aliment Pharmacol** 28:689-703.
- Blé J., Díaz J., y Méndez J.(2007). Suplementación con vitamina E ¿Benéfica o dañina? **Gaceta Medica Mexicana**. 144:147-154.
- Boskovic R., Gargaun L., Oren D., Djulus J. y Koren G. (2005). Pregnancy outcome following high doses of vitamin E supplementation. **Reprod Toxicol**; 20:85-88.
- Camara de Diputados del H congreso de la Unión (2009).Ley general de salud. México.169 pp.
- Chihuailaf R., Contreras F. y Wittwer P. (2002) .Patogénesis del estrés oxidativo: consecuencias y evaluación en salud animal. **Veterinaria México** 33:262-285.
- Clark A. M. (1982). The use of larval stages of *Drosophila* screening for some naturally occurring mutagens. **Mutation Research** 2:89-97.
- Clements J. H., Phillips M. y Todd N. K. (1988) The *Drosophila* wing test: a comparison to the sensitivity of diferent strains, **Mutation Research**. 203:117-123.
- Cohen S.M. (1993). **Imaginal disc development**. En “**The development of *Drosophila melanogaster***” Vol. II (Ed. M. Bate y A. Martínez Arias). New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. P 747-841.
- Demerec. M. (1965). **Biology of *Drosophila***. Hafner Publishing Co. USA, 633 pp.

Dorantes V. Y. A. (2000). Aplicación de *Drosophila melanogaster* como biomonitor indicador de contaminación acuática. Tesis ENEP Iztacala. UNAM. 65 pp.

Environmental Protection Agency (2006). **Public Health Goal for N-Nitrosodimethylamine in Drinking Water**. Pesticide and Environmental Toxicology Branch Office of Environmental Health Hazard Assessment California Environmental Protection Agency. 59 pp.

Espinoza M. J. (2007). Evaluación del potencial genotóxico de Treda<sup>®</sup> en células somáticas de *Drosophila melanogaster*. Tesis Facultad de Ciencias. UNAM. 70 pp.

Feng X., Zhang L., y Zhu H. (2009). Comparative anticancer and antioxidante activities of different ingredients of *Ginkgo biloba* extract (EGb 761). **Planta Med.** 86-90.

Frei H. y Wügler (1988). Statistical methods to decide whether mutagenicity test data from *Drosophila* assays indicate a positive, negative or inconclusive result. **Mutation Research** 203: 297 – 308.

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

Gabbianelli R., Nasuti C., Falcioni G., y Cantamalessa F. (2004). Lymphocyte DNA damage in rats exposed to pyrenoids effect of supplementation whit Vitamins E and C. **Toxicology**,203:17-26.

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

- García-Bellido A. y J. Dapena. (1974). Induction, detection and characterization of cell differentiation mutants in *Drosophila melanogaster*. **Molecular Genetics** 128: 117 – 130.
- García M. V. (2006). Participación de inversiones múltiples en la modulación de la respuesta genotóxica de *Drosophila melanogaster*. Tesis de Licenciatura. UNAM. México. 50 pp.
- Graf U., Würgler F. E., Katz A. J., Frei H., Juon H., Hall C. B. y Kale P. G. (1984). Somatic Mutation and Recombination Test in *Drosophila melanogaster*. **Environmental Mutagenesis** 6:153–188.
- Graf U., Abraham S., Guzmán J. y Würgler F. (1998). Antigenotoxicity studies in *Drosophila melanogaster*. **Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**.402:203-209.
- Halliwell B. (1997). Antioxidants and human disease: a general introduction. **Nutrition Review** 1997;55:S44-S52.
- Hällström I. A., Sundvall U., Rannug R., Grafstrom y Ramel C. (1981) a. The metabolism of drugs and carcinogens in isolated subcellular fractions of *Drosophila melanogaster* activation of vinyl chloride, 2-aminoanthracene and benzo [a]pyrene as measured by mutagenic effects in *Salmonella typhimurium*. **Chem.-biol. Interactions**, 34:129-143.
- Hällström I., y Grafstrom R. (1981) b. The metabolism of drugs and carcinogens in isolated subcellular fractions of *Drosophila melanogaster*. Enzyme induction and metabolism of benzo[a]pyrene. **Chem.-biol. Interactions** 34:145-159.
- Hällström I., Magnusson J. y Ramel C. (1982). Relation between the somatic toxicity of dimethylnitrosamine and a genetically determined variation in

the level and induction of cytochrome P450 in *Drosophila melanogaster*.  
**Mutation Research** 92:161-168.

<http://flymove.un.-muenster.de/>.2008

Karekar V., Joshi S. y Shinde S. (2000). Antimutageniv profile of three antioxidants in the Ames assay and the *Drosophila* wing spot test.**Mutation Research**. 468:183-194.

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

Katz A. J. (1985). Genotoxicity of 5-azactidine in somatic cells of *Drosophila*.  
**Mutation Research**.143:195-199.

Kilbey B. J., Macdonald D.J., Auerbach C., Sobels F.H. y Vogel E. W. (1981). The use of *Drosophila melanogaster* in tests for environmental mutagens. **Mutation Research** 85: 141-146.

Kitts D. y Hu C. (2000). Efficacy and safety of ginseng. **Health Nutrition**.3: 473-485.

Klaassen C. D. y Watkins J. B. (2005). Casarett y Doull. **Fundamentos de Toxicología**. McGraw – Hill Interamericana, Barcelona. 536 pp.

Klug W., Cummings M. and Spencer C. (2006). **Conceptos de Genética**. Pearson Prentice Hall. España 920 pp.

Lindsley D. L. y Zimm G.G. (1992). **The genome of *Drosophila melanogaster***. Academi Press Inc 1132 pp.

- McCall M, y Frei B. (1999). Can antioxidant vitamins materially reduce oxidative damage in humans? **Free Radical Biology & Medicine**.26:1034-1053.
- Muñoz L. B. (2007).Genotoxicidad de una muestra ambiental externa a “Cromatos de México” en células somáticas de *Drosophila melanogaster*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias. UNAM. 68 pp.
- Nöthinger (1970). Sucrose density separation: A method for collecting large number of *Drosophila* larvae. **Drosophila Information Service** 45:177.
- Orhan I., Kartal M., Abu M., Senol F., Yilmaz G. y Sener B. (2009). Free radical scavenging properties and phenolic characterization of some edible plants. **Food chemistry**.114:276-281.
- Parker R, y McCormick C. (2005). Selective accumulation of  $\alpha$ -tocopherol in *Drosophila* is associated with cytochrome P 450 tocopherol- $\omega$ -hydroxylase activity but not  $\alpha$ -tocopherol transfer protein.**Biochemical and Biophysical Research Communications**.338:1537-1541.
- Patenkovic A., Stamenkovic M., Banjanac T. y Andjelkovic M. (2009). Antimutagenic effect of sage tea in the wing spot test of *Drosophila melanogaster*. **Food and chemical Toxicology**. 47:180.183.
- Ramel C. (1991). Pollution, carcinogenesis and cancer prevention. **Acta Oncology** 30:27-33.
- Ramos M. P. (1994).efectos genotóxicos de algunas sales de arsénico en *Drosophila melanogaster*. Tesis de Doctorado. Facultad de Ciencias UNAM.142 pp.
- Ramos M. P., Ordaz M. G., Dorantes A., Rivas H., Campos P., Martínez M., y Hernández B. (2000). *Drosophila* is a Reliable Biomonitor of Water

- Pollution. Biomonitoring and Biomarkers as indicators of environmental change 2. (Butterworth F M, Gunatilaka A and Gonshebbatt M E eds) **Environmental Science Research**, New York. p 257-299.
- Rouse J. (2008). Mechanisms for the preservation of genome stability. **DNA Repair** 7:775-787.
- Sánchez M. y Mendoza V. (2003). Envejecimiento, enfermedades crónicas y antioxidantes . UNAM, Facultad de Estudios Superiores Zaragoza 131 pp.
- Schwartz J. (1996). The dual roles of nutrients as antioxidants and prooxidants: their effects on tumor cell growth. Symposium: Prooxidant effects of antioxidant vitamins. The Experimental Biology '95 meeting, Atlanta, GA, on April 13, 1995.
- Silbergeld. E. K. (2001). **Enciclopedia de salud y seguridad en el trabajo; Toxicología**. Organización Internacional del Trabajo, O.I.T. Ministerio de Trabajo y Asuntos Sociales. España. 84 pp.
- Takahashi O. (1994). Haemorrhagic toxicity of a large dose of alpha beta and gamma tocopherols, ubiquinone beta-carotene, retinol acetate and L-ascorbic acid in the rat. **Food Chemical Toxicology** 33:121-128.
- Trimbrell, J. (2002). **Introduction to Toxicology**. CRC press, USA 215 pp.
- Vogel E. (1975). Mutations in *Drosophila*: some aspects of the detection of potential mutagenic agents in *Drosophila*. **Mutation Research** 29: 241-245.
- Vogel E. y Szakmary A. (1990). Basic principles and evaluation of results of assays measuring genotoxic damage in somatic cells of *Drosophila*. **Mutation and Environment** , Part b: 149 – 158.

- Vogel E.W. y Zijlstra J.A. (1987). Mechanistic and methodological aspects of chemically, induced somatic mutation and recombination in *Drosophila melanogaster*. **Mut Res.** Oct;182(5):243-64 p.
- Williams G. (1989). Structure-activity relationships in the rat hepatocyte DNA repair test for 300 chemicals. **Mutation Research.** 221:263-286.
- Winder. (1993). The Toxicity of lead. **Mutation Research.** USA. 285: 117-124.
- Yamashita N., Murata M., Sumiko I., Mark J., Burkitt, L., and Shosuke Kawanishi. (1998) alpha-Tocopherol Induces Oxidative Damage to DNA in the Presence of Copper(II) Ions. **Chem. Res. Toxicol.** 11:855-862.
- Zainullin V.G., Sheuchenko V. A., Mjasjon E.N., generallova M.V. (1992). The mutation frequency of *Drosophila* populations living under conditions of increased background radiation due to the accident. **Sci total Enviromental.** 112(1):37.44.
- Zijlstra J. A.y Vogel E. W. (1988) a. Metabolic inactivation of mutagens in *Drosophila melanogaster*. **Mutation Research** 198:73-83.
- Zijlstra J. A, Vogel E. W. (1988) b. Influence of inhibition of the metabolic activation on the mutagenicity of some nitrosamines, triazenes, hydrazines and seniciphylline in *Drosophila melanogaster*. **Mutation Research** 202:251-67.
- Zimmering (1987). **Aneuploidy in Drosophila.** Aln Rliss, Inc. 32 pp.