

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
IZTACALA

**“Evaluación del potencial antígeno tóxico del
resveratrol en co-tratamiento con MMS, en el
bioensayo SMART en ala de *Drosophila
melanogaster* (Cruza Estándar)”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

B I Ó L Ó G O

P R E S E N T A:

GARCÍA HUERTA EDUARDO

DIRECTORA DE TESIS:

M. en C. María Eugenia Isabel Heres y Pulido

LOS REYES IZTACALA, EDO. DE MÉX.

2012





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.

**“El verdadero amante de la vida es el científico,
pues es el único que se ocupa de descubrir
sus misterios”**

DEDICATORIA

Con la mayor gratitud y cariño por los esfuerzos que realizaron para que yo lograra terminar mi carrera profesional siendo para mí la mejor de las herencias.

A mi madre por ser la persona más maravillosa en todo el mundo; porque a medida que fui creciendo siempre estuviste a mi lado, por tus sabios consejos en momentos difíciles y por todas las veces que callaste, para que yo aprendiera con tu silencio. Gracias por el apoyo moral, por todo tu cariño y comprensión que desde niño me has brindado, por guiar mi camino y estar junto a mí en todo momento.

A mi padre porque desde pequeño has sido para mi un gran hombre, un hombre maravilloso al que siempre he respetado y admirado, gracias por ser mi amigo y el gran pilar que siempre me ha impulsado a seguir adelante. Gracias por guiar mi vida con energía, porque a pesar de que el mundo nos aplastaba, siempre tuviste la fuerza para levantarnos e impulsarnos a seguir, gracias por llevarme por el camino correcto, esto ha hecho que sea lo que soy.

Con amor, admiración y respeto. A quienes jamás encontraré la forma de agradecer su apoyo, comprensión y confianza esperando que comprendan que mis logros son también suyos e inspirados en ustedes, hago de éste un triunfo y quiero compartirlo por siempre con ustedes.

AGRADECIMIENTOS

A la vida por darme la oportunidad de formar parte de ella, y permitirme estudiarla, comprender su significado y vislumbrar más allá de lo que estamos acostumbrados a ver.

A mi padre Rogelio García por ser el gran pilar que siempre me impulsó para seguir adelante, tanto en lo personal como en lo profesional, por ser mi amigo y mi mayor ejemplo de sabiduría y bondad, gracias por guiarme siempre por el camino correcto, y por ser mi más sabio consejero.

A mi madre Ma. Ignacia Huerta por ser la mejor mamá del mundo, por apoyarme y cuidarme desde pequeño, por estar siempre conmigo guiándome e impulsándome siempre a seguir adelante. Gracias por todo tu cariño y por todas las cosas que has hecho por mí.

A mis hermanos Fer y Wicho, por ser mis compañeros de toda la vida, porque siempre hemos aprendido de la vida juntos, por todo el apoyo que me han brindado y por todas las grandes cosas que hemos hecho, a Fer, por ser mi manager y por tus grandes consejos, a Wicho, por tus geniales aportaciones y por todas las pláticas que hemos tenido, Gracias.

A mi asesora de tesis la M. en C. María Eugenia Heres, gracias por toda la ayuda que me brindó para que pudiera realizar este trabajo, por sus consejos y por darme su confianza, y gracias por su buen humor.

A mis buenos amigos Julio, Edi, Jesica, Lalo, Adriana, por todos los buenos momentos que hemos pasado desde la prepa y por la amistad que me han brindado.

A mis amigos de la universidad, Manolo y Ishus por su gran apoyo y su sincera amistad, a Bibi, Erika, Claus y Mich, por ser mis grandes amigas, a todos por compartir conmigo esta etapa de mi vida.

A mis amigas del laboratorio, Sofi y Jacky, cómo olvidarme de esos momentos agradables que compartimos en el lab, gracias por brindarme su amistad y hacer que la estancia y el trabajo en él fuera más agradable.

Al profesor Luis Felipe Santos y a la maestra Irma Dueñas por toda la ayuda que me brindaron, gracias por hacerme sentir parte del laboratorio y por sus grandes consejos lo cuales me ayudaron a crecer profesionalmente.

A los revisores de tesis, la Dra. Ana María García Bores, el Dr. Guillermo Ávila, y el Dr. Saúl Flores, por sus aportaciones y sus críticas constructivas hacia este trabajo.

Contenido

Contenido	- 6 -
Índice de figuras.....	- 8 -
Lista de abreviaturas.....	- 9 -
Resumen	- 10 -
Introducción	- 11 -
<i>Resveratrol</i>	- 12 -
Metabolismo del resveratrol.....	- 14 -
<i>Metil metanosulfonato</i>	- 16 -
<i>Daño oxidativo y especies reactivas de oxígeno</i>	- 17 -
Antecedentes	- 20 -
Justificación	- 23 -
Hipótesis	- 23 -
Objetivo General	- 24 -
<i>Objetivos Particulares</i>	- 24 -
Materiales y Métodos	- 25 -
<i>Químicos</i>	- 25 -
<i>Prueba de Mutación y Recombinación Somática (SMART) en ala</i>	- 25 -
<i>Tratamientos</i>	- 26 -
<i>Análisis al microscopio y conteo de clones por individuo</i>	- 27 -
<i>Estadístico SMART</i>	- 27 -
Resultados y Discusión	- 30 -
<i>Testigos negativos (disolventes)</i>	- 31 -
<i>Testigos positivos (mutágeno + disolvente)</i>	- 33 -

<i>Tratamientos resveratrol</i>	- 35 -
<i>Co-tratamientos RES/MMS</i>	- 38 -
Conclusiones	- 42 -
Referencias.....	- 43 -
Anexos.....	- 54 -
<i>Metabolismo de xenobióticos</i>	- 54 -
<i>Prueba SMART en ala</i>	- 57 -
<i>Drosophila melanogaster</i>	- 59 -
<i>Eventos de pérdida de heterocigosis</i>	- 60 -

Índice de figuras

Figura 1 Estructura molecular del resveratrol, en su forma <i>cis</i> a) y <i>trans</i> b)	12
Figura 2 Estructura química de los principales metabolitos derivados del RES	16
Figura 3 Estructura molecular del metil metanosulfonato (MMS)	17
Figura 4 Modelo para la producción de ROS por una mala reparación en respuesta al daño producido por el MMS	1
Figura 5 Química de las especies reactivas de oxígeno (ROS).....	19
Tabla I Resumen de resultados obtenidos con SMART en ala de <i>Drosophila</i>	30
Figura 6 Frecuencia de manchas pequeñas, grandes, gemelas y totales por individuo de los testigos negativos.	32
Figura 7 Distribución acumulada del tamaño de los clones <i>mwh</i> de los testigos negativos	32
Figura 8 Frecuencia de manchas pequeñas, grandes, gemelas y totales por individuo de los testigos positivos	34
Figura 9 Distribución acumulada del tamaño de los clones <i>mwh</i> de los testigos positivos	34
Figura 10 Frecuencia de manchas pequeñas, grandes, gemelas y totales por individuo de los tratamientos RES (2.5, 10 y 40 µg/mL) comparados con el testigo negativo.....	36
Figura 11 Distribución acumulada del tamaño de los clones <i>mwh</i> de los tratamientos RES (2.5, 10 y 40 µg/mL) comparados con el testigo negativo EtOH 1%	37
Figura 12 Frecuencia de manchas pequeñas, grandes, gemelas y totales por individuo de los co-tratamientos RES/MMS (2.5, 10 y 40 µg/mL) comparadas con el testigo EtOH/MMS.....	39
Figura 13 Distribución acumulada del tamaño de los clones <i>mwh</i> de los co-tratamientos RES/MMS (2.5, 10 y 40 µg/mL) comparadas con el testigo EtOH/MMS	39
Figura 14 Reacciones del metabolismo xenobiótico	55
Figura 15 Ciclo de vida de <i>Drosophila melanogaster</i>	60
Figura 16 Eventos genéticos que conllevan a la pérdida de heterocigosis de los genes marcadores <i>flr³</i> y <i>mwh</i> y su consiguiente expresión fenotípica.....	61
Figura 16 (Continuación) Eventos genéticos que conllevan a la pérdida de heterocigosis de los genes marcadores <i>flr³</i> y <i>mwh</i> y su consiguiente expresión fenotípica.....	62

Lista de abreviaturas

+ positivos

- negativo

↓ disminución significativa

★ estadísticamente significativo

µg/mL microgramos por mililitro

ATP adenosin trifosfato

CE Cruza Estándar

CYP450s Citocromos P450

DNA deoxyribonucleic acid (por sus siglas en inglés)

EtOH etanol

flr³ flare

H₂O₂ peróxido de hidrógeno

HR humedad relativa

mM milimolar

MMS metil metanosulfonato

mwh multiple wing hair

N3A nitrógeno 3 de la adenina

N7G nitrógeno 7 de la guanina

N3-meA adición de grupo metil en el nitrógeno 3 de la adenina

N7-meG adición de grupo metil en el nitrógeno 7 de la guanina

NADPH nicotinamida adenina dinucleótido fosfato en su forma reducida

NO óxido nitroso

•OH radical hidroxilo

O₂⁻ radical superóxido

O₂ oxígeno molecular

ONOO- radical peroxinitrito

REDOX reacción de óxido reducción

RES resveratrol

ROS especies reactivas de oxígeno

Resumen

El envejecimiento de las poblaciones humanas y el desarrollo de enfermedades degenerativas como el cáncer, han llevado a la implementación de nuevos tratamientos, utilizando compuestos químicos tanto sintéticos como naturales, que ayuden a prevenir, controlar e incluso abatir este tipo de enfermedades; ejemplo de estos compuestos químicos es el resveratrol (RES), un polifenol presente principalmente en la cáscara de las uvas rojas, al cual se le atribuyen propiedades antioxidantes, antiproliferativas, de regulación del ciclo celular e inducción de apoptosis, entre otras. Sin embargo, aún no se han demostrado con claridad sus propiedades antígenotóxicas en sistemas *in vivo*, y tampoco se ha evaluado si este compuesto puede disminuir o aumentar el daño genotóxico de los compuestos con los que se asocia. Por lo anterior, se evaluó el efecto del RES sobre el daño producido por un mutágeno directo y oxidante indirecto, el metil metanosulfonato (MMS), en la prueba SMART en ala de mosca que utiliza un modelo eucarionte *in vivo* (*Drosophila melanogaster*). Al comparar estadísticamente los tratamientos RES (2.5, 10 y 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$) contra Etanol (EtOH 1%) se obtuvieron resultados positivos para RES 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en manchas grandes que podrían derivarse de un efecto pro-oxidante; sin embargo, para RES 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ las frecuencias en manchas pequeñas fueron menores. Se propone que esto sea producto de una modulación del ciclo celular, dado que se alteró la distribución del tamaño del clon en los tratamientos RES 10 y 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Los resultados de la comparación entre los testigos EtOH/MMS vs. Agua/MMS fueron positivos en manchas pequeñas, gemelas y totales, por lo que el MMS disuelto en etanol aumentó el daño. Al comparar los co-tratamiento RES (2.5, 10 y 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$)/MMS vs. el testigo EtOH/MMS no hubo diferencia significativa para ningún tipo de mancha, ni en la distribución del clon, por lo que no se encontró efecto protector alguno por parte de RES con respecto al efecto del MMS *in vivo*.

Palabras clave: antioxidante, apoptótico, genotoxicidad, *in vivo*, mutágeno, quimiopreención, resveratrol.

Introducción

El envejecimiento de las poblaciones humanas y el desarrollo de enfermedades degenerativas como el cáncer, han llevado a la implementación de nuevos tratamientos, utilizando compuestos químicos tanto sintéticos como naturales, que ayuden a prevenir, controlar e incluso abatir esta enfermedad.

La quimioprevención consiste en la utilización de determinadas sustancias químicas, naturales o sintéticas con vistas a impedir o revertir el desarrollo de enfermedades crónico degenerativas, evitando que puedan alterar el equilibrio funcional del organismo (Martínez, 2000). La quimioprevención pretende reducir la incidencia del cáncer, siendo su principal y primer objetivo, la identificación de compuestos que permitan desarrollar estrategias encaminadas a este fin y su aplicación en la población humana (Surh, 1999). En la actualidad se conoce que el cáncer es un proceso con múltiples estadios, producto de la acumulación en una célula de sucesos genéticos y epigenéticos (Forrest, 2012). El riesgo celular de acumular mutaciones potencialmente oncogénicas depende de la frecuencia con que se producen las lesiones en el DNA y de la capacidad que tengan las células de repararlas. La estabilidad genética está dada por el equilibrio entre ambos procesos y esta misma puede ser alterada por la acción de varios agentes ambientales, provocando un efecto mutagénico (Loeb y Loeb, 2000). Dado que los compuestos que se acumulan en el medio ambiente están ampliamente relacionados con el desarrollo de muchos tipos de cáncer en humanos, su eliminación o neutralización es de vital importancia para contribuir a la prevención de tal padecimiento (Barret, 2000).

En las poblaciones humanas, la prevención frente a enfermedades relacionadas con las mutaciones implica tanto evitar la exposición a agentes mutágenos y cancerígenos así como una adecuada quimioprevención. Los productos empleados en la quimioprevención han demostrado actividad antimutagénica, antiproliferativa y antioxidante en mayor o menor medida (Martínez, 2000).

Los compuestos naturales derivados de plantas, han demostrado ser una opción importante como agentes quimiopreventivos contra el cáncer y otros padecimientos de riesgo. Dentro de éstos encontramos a los polifenoles, de los que podemos destacar al resveratrol (RES).

Resveratrol

El resveratrol (3,4',5-*trans*-trihidroxiestilbeno) es un compuesto trifenólico que se encuentra principalmente en la cáscara de las uvas rojas, frutas rojas y una gran variedad de plantas. El RES se encuentra en la naturaleza en forma de isómeros *cis* y *trans* (Figura 1), siendo la forma *trans* la más representativa y la que brinda mayores beneficios a los humanos, puesto que se ha reportado que en esta forma es químicamente más activa (Delmas *et al.*, 2011) y además por su alta biodisponibilidad y gran actividad en procesos biológicos (King *et al.*, 2006). Aunque el *trans*-resveratrol parece absorberse bien en los humanos, su disposición es relativamente baja debido a su rápido metabolismo (30 a 90 min) y eliminación vía renal (~8 h), obteniéndose niveles muy bajos (de µg a ng) en el plasma, dependiendo de la forma de administración (Cottart *et al.*, 2010).

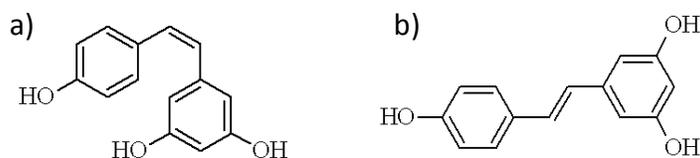


Figura 1. Estructura molecular del resveratrol, en su forma *cis* a) y *trans* b) (Tomado de Namasivayam, 2011).

La actividad antioxidante del RES se debe a su capacidad de reducir la producción de radicales libres, o bien por inhibición de enzimas responsables de la generación de éstos (Alarcón y Villegas, 2007). Además, por su alto potencial *REDOX*, es capaz de reducir las especies reactivas de oxígeno (ROS) altamente oxidantes, como el $\bullet\text{OH}$. Uno de los factores más importantes que determina la actividad antioxidante del RES está dado por su fórmula química, la cual le confiere una alta capacidad de reducción, debido a la posición de los hidroxilos ácidos en la molécula (Stivala *et al.*, 2001), principalmente por el grupo hidroxilo del C4', el cual se ha reportado como el más reactivo debido al efecto de resonancia química (Seeram *et al.*, 2006), así como los dobles enlaces presentes en sus anillos fenólicos (Manach *et al.*, 2006).

Ya que el estrés oxidativo y el daño celular producido por las ROS son los causantes de un gran número de enfermedades crónicas, que incluyen cáncer y enfermedades cardiovasculares, los antioxidantes juegan un papel muy importante para el desarrollo de terapias farmacológicas preventivas o coadyuvantes (Boveris, 2005).

Además, el RES es capaz de estimular a la familia de genes *SIRT1*, que codifican a las sirtuinas (desacetilasas de histonas dependientes de NADPH) (Brooks y Gu, 2009; Yu *et al.*, 2012), que son las proteínas relacionadas con el retraso del envejecimiento, enfermedades cardiovasculares y la mejora de los procesos metabólicos, así como procesos de reparación de DNA, regulación del ciclo celular, metabolismos de lípidos y sensibilidad a la insulina (Wei *et al.*, 2012). Por lo tanto, pone en marcha los procesos metabólicos relacionados con la duración de la longevidad, donde, según estudios realizados, la restricción calórica juega un papel muy importante, dado que una baja concentración de calorías es capaz de alargar la vida (Millán *et al.*, 2008).

De forma natural, el RES funciona como una fitoalexina que protege a las plantas contra infecciones por hongos. Sin embargo, puede tener otros efectos en células

en cultivo, tales como un efecto lipolítico en células diferenciadas 3T3-L1. (Celis *et al.*, 2008).

Sin embargo, los resultados de estudios de farmacocinética indican que el RES que circula por el organismo es metabolizado rápidamente, y se han puesto en duda los efectos fisiológicos que este compuesto provoque con las altas concentraciones que se utilizan para los experimentos *in vitro* (Cottart *et al.*, 2010). Por ello, son necesarios más estudios para demostrar si verdaderamente el RES y sus metabolitos protegen a los organismos del daño genotóxico, de las enfermedades degenerativas, si se acumulan en los sistemas vivos, o si al estimular a otro tipo de factores, el RES pueda presentar efectos protectores (Baur y Sinclair, 2006). Por otro lado, a la fecha no se han reportado efectos adversos del RES en modelos murinos, ni en estudios de toxicidad en humanos (Delmas *et al.*, 2011; Cottart *et al.*, 2010), y ha sido muy recomendada una dosis no mayor a 450 mg al día (Edwards *et al.*, 2011).

Metabolismo del resveratrol

Diversos estudios han demostrado que la absorción vía oral del RES depende mucho de que se administre con alimentos, solo o del disolvente utilizado, puesto que la solubilidad en agua disminuye más que con otros solventes como el EtOH, lo que puede tener efecto en la distribución en el organismo. Por el contrario, el EtOH es utilizado principalmente para aumentar la solubilidad del RES (50 mg/mL que equivalen a una solución de EtOH 5%) (Delmas *et al.*, 2011). Una vez ingerido, el RES es rápidamente metabolizado principalmente en hígado, en donde diversos estudios han demostrado que pocas veces es metabolizado en FASE I por medio CYP1A2, CYP3A4 y CYP2E1 (Delaporte y Wilkinson, 1998); en la mayoría de los casos pasa directamente a FASE II del metabolismo xenobiótico (ver Anexo 1), y se conjuga con diferentes moléculas dando como resultado una gran variedad de metabolitos (Yu *et al.*, 2002; Zhu *et al.*, 2003; Wenzel y Somoza,

2005; Wang *et al.*, 2005; Athar *et al.*, 2007). Wang y colaboradores (2005), caracterizaron por espectrometría cuatro metabolitos del RES en orina de ratón, el resveratrol monoglucurónido, el resveratrol monosulfato y el 7,8-dihidro resveratrol monosulfato (Figura 2, a-e). Por otro lado, Szekeres y colaboradores (2011), caracterizaron el resveratrol-3-glucurónido, el cual mostró una alta actividad antioxidante por si solo. Lo que indica que el RES conjugado, puede tener diferentes efectos en sistemas *in vivo*. Además, se han identificado otros metabolitos del RES producto de FASE I, el 3,4,5,3',4',5-hexahidroxi-trans-estilbeno (Murias *et al.*, 2005) y el piceatanol (Zhu *et al.*, 2005) (Figura 2, f y g). Stivala y colaboradores (2001), sintetizaron cuatro metabolitos, el 3,5-dihidroxi-4,9-metoxiestilbeno, el 3,5-dimetoxi-4,9-hidroxiestilbeno, el 3,4,9,5-trimetoxiestilbeno y el α - β -dihidro-3,4,9,5-trihidroxiestilbeno. Lo anterior indica, que los metabolitos del RES y el efecto que puedan tener dentro de un organismo, dependerán en gran medida de las moléculas con las cuales se haya conjugado en la FASE II del metabolismo xenobiótico y puede presentar o no propiedades benéficas para el organismo. Además, este metabolismo incluye una serie de reacciones químicas que generan ROS como el $O_2^{\cdot-}$ y el H_2O_2 , que pueden tener efectos genotóxicos para el organismo (Delmas *et al.*, 2011) actuando como un agentes pro-oxidantes (Alarcón y Villegas, 2007).

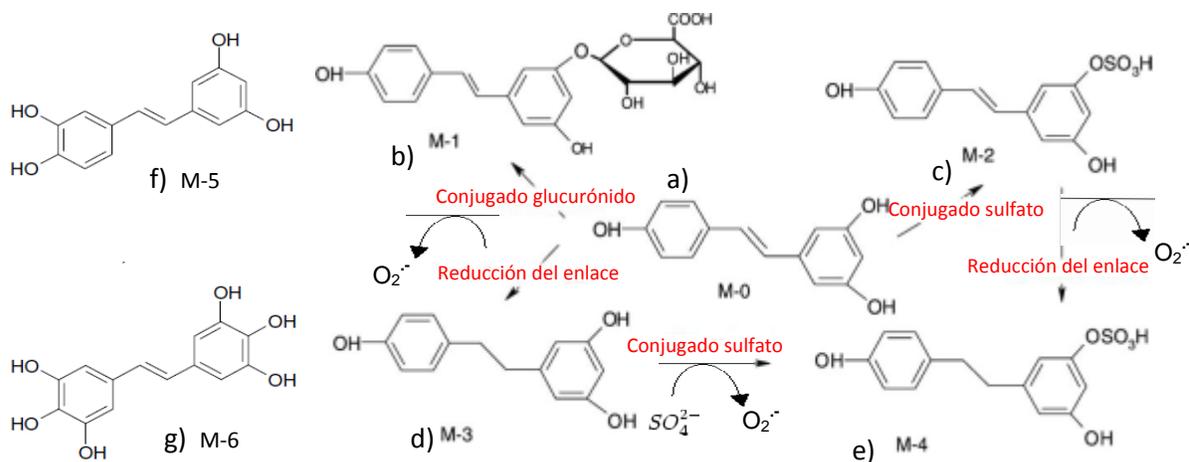


Figura 2. Estructura química de los principales metabolitos derivados del RES: FASE II a) *trans*-RES, b) resveratrol monoglucurónido (M1), c) 7,8-dihidroresveratrol (M2), d) resveratrol monosulfato (M3) y e) 7,8-dihidro resveratrol monosulfato (M4). FASE I f) piceatanol (M5) y g) 3,4,5,3',4',5-hexahidroxi-*trans*-estilbeno (M6) (Tomado de Wang *et al.*, 2005; Szekeres *et al.*, 2011).

Metil metanosulfonato

El metil metanosulfonato (MMS) es un compuesto utilizado como solvente, y agente quimioterapéutico en el tratamiento de diversos cánceres humanos (Lee *et al.*, 2007). Es un alquilante (Figura 3) que actúa de manera directa, sin pasar por un metabolismo xenobiótico, donde su principal mecanismo de acción es la transferencia de un grupo metilo (CH_3^+); además presenta gran afinidad a los centros nucleofílicos del DNA, especialmente en los N7G y N3A, y como consecuencia forma metil-aductos, principalmente el N7-meG y el N3-meA (Jenkins *et al.*, 2005), que presentan gran actividad mutagénica por sus efectos después de la replicación (Beranek, 1990). Además, ha sido demostrado que el MMS actúa como agente oxidante indirecto, por una reparación deficiente en respuesta al daño producido al DNA, teniendo como consecuencia indirecta la producción de ROS (Figura 4), principalmente $\cdot\text{OH}$ y H_2O_2 (Rowe *et al.*, 2008). Estas condiciones han permitido considerar a este compuesto como un indicador positivo de genotoxicidad (Siddique *et al.*, 2005), por lo cual es muy práctico su uso como un control positivo en investigaciones toxicogenéticas. Además, el efecto del MMS puede ser revertido y reparado por tratamiento con algunos compuestos naturales (Franke *et al.*, 2005).

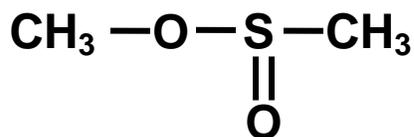


Figura 3. Estructura molecular del metil metanosulfonato (MMS)
(Tomado de Tao *et al.*, 1993).

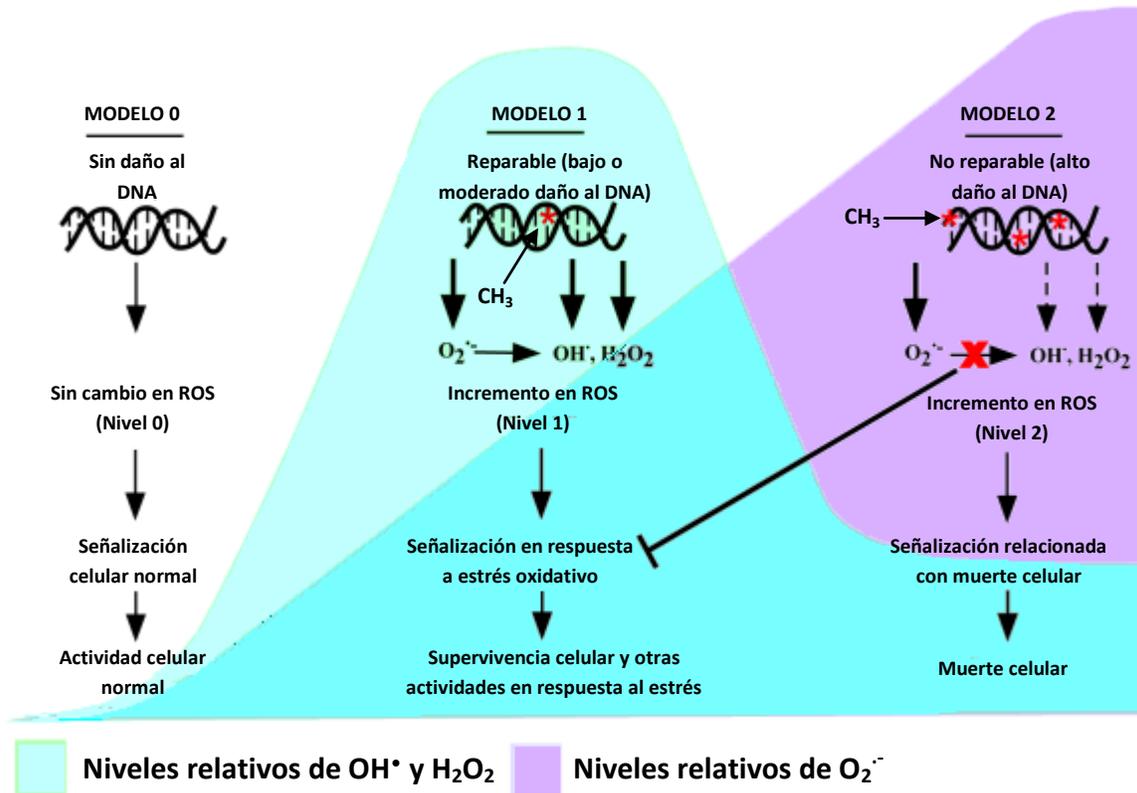


Figura 4. Modelo para la producción de ROS por una mala reparación en respuesta al daño producido por el MMS (Tomado de Rowe *et al.*, 2008).

Daño oxidativo y especies reactivas de oxígeno

En la actualidad se tiene conocimiento de que muchas de las enfermedades crónico degenerativas tienen relación con daños a biomoléculas causados por estrés oxidativo (Brodská y Holoubek, 2011). El estrés oxidativo es un estado de la célula en el cual se encuentra alterada la homeostasis del estado de óxido-reducción intracelular, lo cual se produce a causa de una excesiva producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y/o por la deficiencia en los mecanismos antioxidantes de homeostasis, conduciendo a un daño celular.

Las ROS son moléculas muy reactivas, que se clasifican en: las de tipo radical libre y las de tipo no radical (Lozada y García, 2009). Los radicales libres son todas las especies que contienen uno o más electrones desapareados (Opara, 2006). Dentro del grupo de radicales libres se encuentran: el superóxido ($O_2^{\cdot-}$), el radical más abundante, producto de la oxidación de moléculas orgánicas y resultado de múltiples procesos metabólicos (Haliwell, 2006); el oxígeno singulete (1O_2); el radical hidroxilo ($\cdot OH$), el más tóxico entre los radicales, se produce a partir de la reacción del radical superóxido con el peróxido de hidrógeno o por la reacción de Fenton; el óxido nítrico ($NO\cdot$), cuyo efecto tóxico se produce al mezclarse con el radical superóxido y formar peroxinitrito ($ONOO^-$) que, por tratarse de una molécula que no es radical libre, es mucho más estable y puede generar efecto tóxico a largo plazo (Haliwell, 2006). Entre las moléculas de tipo no radical, además del peroxinitrito, se menciona el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), ya que es el oxidante “más estable” de todos, sin embargo mediante reacciones químicas como la reacción de Fenton/Haber-Weiss, puede generar el radical $\cdot OH$ que presenta alta reactividad (Held, 2010).

La generación de ROS a partir del oxígeno molecular es un proceso fisiológico que tiene lugar en las células de todos los organismos aeróbicos (Held, 2010). La oxidación es un proceso electroquímico por el cual un ion o átomo pierde uno o varios electrones. Como resultado se producen las ROS, moléculas muy inestables (Figura 5), con electrones desapareados capaces de reaccionar con varias moléculas orgánicas, tales como lípidos, proteínas y DNA (Kang *et al.*, 2012). Como consecuencia de lo anterior, se produce una respuesta celular que conduce a una reparación del daño, el cual si no es corregido correctamente, produce alteraciones en la célula que pueden causar un desequilibrio en el funcionamiento y como consecuencia el desarrollo de eventos tales como el envejecimiento celular, apoptosis y/o enfermedades crónico-degenerativas. Por otro lado, existen compuestos que forman parte de sistemas de defensa antioxidantes los cuales se unen a las ROS para neutralizar su acción oxidante, eliminándolas y evitando de esta forma que puedan producir daño a las

biomoléculas (Sakihama *et al.*, 2002). Sin embargo, muchos de estos antioxidantes pueden convertirse en radicales libres al momento de neutralizar a una ROS o bien por producto de su metabolismo, causando ellos mismos un daño oxidativo, por lo cual son conocidos como pro-oxidantes (Winterbourn, 2009).

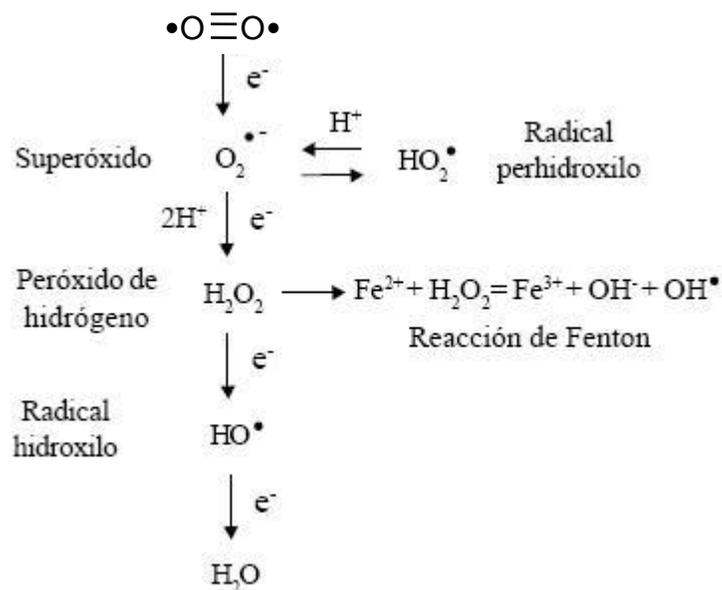


Figura 5. Química de las especies reactivas de oxígeno (ROS). Las ROS son generadas por una reducción secuenciada del O₂ (Tomada de Benezzer *et al.*, 2008).

Antecedentes

Múltiples estudios han demostrado la capacidad quimioprotectora y de modelación del metabolismo por parte del RES en diversos modelos. Wang y colaboradores (2004) demostraron el papel potencial del RES en el control de la replicación del virus de inmunodeficiencia humana-1 (VIH-1), ya que puede actuar sinérgicamente con los fármacos existentes, potenciando su efecto antiviral. Delaporte y Wilkinson (1998) demostraron en microsomas humanos incubados con RES, a niveles micromolares, que la actividad de los CYP1A2, CYP3A4 y CYP2E1 se incrementó moderadamente, además de que indujo la FASE II de biotransformación. Por su parte, Boyce y Gooderham (2000) demostraron que la actividad del *cis* y *trans*-RES en células CD2F1 de ratones (de cuatro a seis semanas de edad), causó una inhibición casi completa del CYP1A2 que metaboliza el benzopireno.

De igual forma se ha demostrado la capacidad del RES como agente antioxidante, Ungvari y colaboradores (2007) demostraron la capacidad del RES para inducir resistencia al estrés oxidativo mediante la eliminación de radicales tales como el H_2O_2 y la inducción de enzimas antioxidantes como la glutatión peroxidasa, la catalasa y la súper óxido dismutasa (SOD). Alarcón y Villegas (2007) muestran la capacidad del RES como eliminador de ROS debido a sus propiedades *REDOX* y su capacidad de deslocalizar los radicales libres. Delmas y sus colaboradores (2011) demostraron que el RES y sus metabolitos presentan gran actividad antioxidante. Yu y colaboradores (2012) determinan el papel como antioxidante del RES principalmente por inhibición de la producción intracelular y extracelular de ROS y por estimulación de los genes que codifican para las sirtuinas (*SIRT1* a la *SIRT7*).

El RES también ha presentado capacidad antiproliferativa y apoptótica, Lin y Tsai (1999), observaron que el RES tiene la capacidad de detener el proceso de carcinogénesis, es decir, la iniciación del tumor, promoción y progresión a través del bloqueo de la transducción de señales celulares, y la captación de ROS.

Nakagawa y colaboradores (2001) demostraron que el RES administrado en dosis de 17.12 mg/mL, fue capaz de suprimir el crecimiento de las células de cáncer de mama ER-positivas (*KPL-1* y *MCF-7*) y ER-negativas (*MKL-F*) estimuladas *in vitro* por el ácido linoleico. Matsuoka y colaboradores (2001) analizaron el ciclo en cultivo de células de pulmón de hámster chino (CHL) donde el RES causó la detención de la fase S y la apoptosis inducida después de un tratamiento de 48 h. Por su parte, Aggarwal y colaboradores (2004) demostraron que el RES presenta efectos antiproliferativos mediante la inducción de apoptosis en líneas celulares cancerosas de diverso origen, tales como las leucemias, de mama, próstata, colon, páncreas, de cabeza y cuello. Bhardwaj y colaboradores (2007) determinaron la capacidad del RES para inducir apoptosis e inhibir la proliferación celular en líneas celulares inducidas con múltiples mielomas. Yun Lin y colaboradores (2011) concluyeron que el RES presenta propiedades antimutagénicas y anticancerígenas al demostrar que estimula factores que actúan como co-activadores al formar complejos con pERK1/2 y p53 e induciendo apoptosis en células cancerosas. Szekeres y colaboradores (2011) sintetizaron dos compuestos químicos derivados del RES (polimetoxilo y polihidroxilo) los cuales inhibieron el crecimiento en células tumorales, así como la actividad de la ciclooxygenasa-2 de diferentes melanomas humanos inducidos en un modelo murino. Hsieh y colaboradores (2011) determinaron que el RES es capaz de regular la proliferación celular y la expresión de genes en cáncer de mama por la activación de diferentes vía de señalización principalmente p53.

También existen algunos estudios de toxicidad en donde se evaluó la actividad genotóxica del RES, sin embargo dichos estudios han sido aplicados en modelos *in vitro*, tales como el de Yan y colaboradores (2011) quienes mediante el ensayo cometa, demostraron que el RES y tres de sus metabolitos (quinolina-4-vinilbenceno-1,3-diol; 3,5-dimetoxiestiril-quinolina y 3,5- dimetoxiestiril) presentaron actividad protectora significativa contra el daño oxidativo al DNA inducido por EtOH (100 mM). Por otro lado, Langová y colaboradores (2005) evaluaron el efecto antimutagénico del RES contra tres mutágenos diferentes (aflatoxina B1

(AFB₁), 2-amino-3-metilimidazolquinolina (IQ) y N-nitroso-N-metilurea (MNU)) mediante la prueba de Ames encontrando que sólo hubo efecto antimutagénico contra los mutágenos indirectos AFB₁ y IQ, y no hubo efecto aparente contra el mutágeno directo MNU; además, mediante el ensayo de micronúcleos detectaron una disminución significativa de mutagénesis para los tres mutágenos. Sgambato y colaboradores (2001) determinaron mediante el ensayo cometa la capacidad del RES para reducir la fragmentación del DNA nuclear, inducido por estrés oxidativo. De Salvia y colaboradores (2002) determinaron que el RES por sí solo no presentaba actividad genotóxica, y mediante el ensayo cometa demostraron la capacidad del RES para disminuir el daño producido por el H₂O₂. Uenobe y colaboradores (1996) demostraron mediante la prueba Ames el efecto antimutagénico del RES contra Trp-P-1. Fu y colaboradores (2004) mediante la prueba de Ames, demostraron que el RES (100 µg) inhibió el 42.2% de la reversión en *Salmonella typhimurium* TA100 inducida por el MMS y a 200 µg inhibió el 91.8% de las reversiones inducidas por el benzopireno. Hasta el momento no existen estudios previos de genotoxicidad por parte del RES en *D. melanogaster*.

Por otra parte, existen estudios de genotoxicidad en la prueba SMART en ala con *D. melanogaster* donde se ha evaluado la actividad de diversos antioxidantes vs. el efecto del MMS. Sánchez (2006) valoró el efecto del sulforafano en co-tratamiento con MMS (0.5 mM) obteniendo una disminución en la actividad del MMS, concentración-respuesta, lo que indica un efecto protector por parte del sulforafano. Arista (2008) evaluó el efecto de la vitamina C (5.6 mM) ante el MMS (0.5 mM) también obtuvo una disminución del daño provocado por el MMS en co-tratamiento con vitamina C y propone que ésta pudo haber inducido reparación del daño y apoptosis. Martin (2012) evaluó con SMART en ala, la actividad del licopeno (0.45, 0.90, 1.8 µM) vs. el MMS (0.5 mM) obteniendo que dependiendo de la cruz, estándar o bioactivación elevada, el licopeno disminuyó o aumentó la frecuencia de manchas, respectivamente y alteró la división celular en los tratamientos con MMS.

Justificación

Dada la situación actual, el crecimiento desmesurado de la población y el desarrollo de enfermedades degenerativas como el cáncer, que se presentan con mayor frecuencia que antes, causando severos daños y en la mayoría de los casos provocando la muerte, se han implementado protocolos para la búsqueda de nuevos medicamentos que ayuden a prevenir, controlar e incluso abatir estas enfermedades, desarrollando tratamientos tanto químicos como naturales, ejemplo de estos últimos es el resveratrol. Como se ha descrito anteriormente, éste presenta propiedades anticancerígenas e inclusive puede retrasar el envejecimiento por su efecto antioxidante o la inducción de otras respuestas celulares; sin embargo, aún no se ha demostrado si presenta propiedades antigenotóxicas en sistemas *in vivo*, además de que tampoco se ha evaluado si puede disminuir o aumentar el daño genotóxico de los compuestos con los que se asocia. Por todo lo anterior, el presente trabajo pretende contestar a la siguiente interrogativa: ¿El resveratrol tendrá efecto antigenotóxico sobre el daño inducido por un mutágeno directo y oxidante indirecto (MMS)?, en la prueba SMART en ala (ver Anexo 2) que utiliza un modelo *in vivo* (*Drosophila melanogaster*) (ver Anexo 3).

Hipótesis

Dado que existen múltiples estudios que demuestran la actividad antioxidante y antiproliferativa del RES y si éste protege de la acción del MMS, disminuyendo el daño genotóxico en la prueba en ala (SMART) en *Drosophila melanogaster* Cruza Estándar (CE), entonces se reducirá la frecuencia de manchas/ individuo/ tratamiento. Además, si el RES es capaz de afectar la división celular, entonces se modificará significativamente la distribución acumulada de clones *mwh* en los individuos tratados.

Objetivo General

- Evaluar el efecto antigenotóxico del resveratrol en co-tratamiento con MMS, en el bioensayo SMART en ala de *Drosophila melanogaster* (Cruza Estándar).

Objetivos Particulares

- Determinar la modificación del RES sobre el daño genotóxico producido por el MMS
- Determinar la modificación de la división celular en las células de los discos imaginales del ala de *D. melanogaster* tratadas con RES/MMS.
- Comparar el efecto del disolvente utilizado sobre los tratamientos MMS.

Materiales y Métodos

Químicos

Resveratrol. Donado por la Dra. Ana María García Bores del laboratorio de Fitoquímica (UBIPRO) de la FES-Iztacala, UNAM, quien lo aisló de *Yucca periculosa* (Baker); la autenticidad del compuesto fue determinada mediante su espectro de resonancia magnética nuclear de protones y ^{13}C (RMNH y RMN ^{13}C).

Metil metanosulfonato (MMS) (CAS 66-27-3, pureza 98%, 0.5 mM). Obtenidos de Sigma-Aldrich (St. Luis, MO, EE.UU).

Etanol 1% (EtOH 1%) grado reactivo (CAS 64-17-5, pureza 99%). Obtenido de ©Merck KGaA (Darmstadt, Alemania).

El Medio Instantáneo Drosophila (DIM, por sus siglas en inglés) se obtuvo de *Carolina Biological Supply Co* (Burlington, North Carolina, EUA).

Para la propagación de las líneas se usaron hojuelas de papa deshidratada Maggie®, posteriormente hidratadas con solución conservadora (5 mL de ácido propiónico + 5 mL de Tegosept 12%) (Dueñas *et al.*, 2001).

Para la colecta de huevos se utilizó levadura fresca La Florida® activada con sacarosa y agua del grifo.

Prueba de Mutación y Recombinación Somática (SMART) en ala

Se realizó la cruce estándar con hembras vírgenes *flr³/TM3, Bd⁶* de la línea flare de *D. melanogaster* las cuales fueron cruzadas con machos *mwh/mwh* de la línea

multiple wing hair. Para ello, inicialmente se realizó la propagación de dichas líneas en el medio de cultivo con 5 g de hojuela de papa hidratados con 20 mL de solución conservadora como bactericida y fungistático y manteniéndolas a una temperatura de $25^{\circ} \pm 2^{\circ} \text{C}$ y 65% de humedad relativa (HR) (Dueñas *et al.*, 2001). Posterior a esto, se prosiguió con el aislamiento de hembras vírgenes de la línea flare obteniendo un total de 200 hembras. Simultáneo a lo anterior se aislaron machos de la línea multiple wing hair obteniendo un total de 100 machos. Por último, se realizó la cruce teniendo para la cruce Estándar (CE): 200 hembras vírgenes flare X 100 machos multiple wing hair manteniéndolos en medio de cultivo de hojuela de papa hidratada con solución conservadora a una temperatura de $25^{\circ} \pm 2^{\circ} \text{C}$ y 65% de HR. Tres días después de realizar la cruce se prosiguió con la colecta de los huevos por 8 h en botellas de cultivo con levadura activada con sacarosa a $25^{\circ} \pm 2^{\circ} \text{C}$ y 65% de HR.

Tratamientos

Después de 72 ± 4 h se obtuvieron las larvas del tercer estadio de la CE las cuales fueron sometidas a los tratamiento con RES a tres concentraciones de 2.5, 10 y 40 (μg RES/mL etanol) en co-tratamiento con MMS 0.5 mM, respectivamente, y con sus correspondientes grupos testigo, para lo cual se utilizaron como testigos positivos los tratamiento MMS 0.5 mM + EtOH 1% y MMS 0.5 mM + Agua y como testigos negativos EtOH 1%, Agua y los tratamientos RES 2.5, 10 y 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (siendo 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ la concentración descrita en plasma humano, 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ está por encima y 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ por debajo de la descrita en Cottart *et al.*, 2010) + EtOH 1%. Todos los tratamientos y testigos fueron realizados en DIM e incubados a $25^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$, 65% de HR, hasta completar su desarrollo. Todos los tratamientos se realizaron por triplicado en tres experimentos independientes, sometiendo a las larvas a tratamientos crónicos de ~48 h.

Análisis al microscopio y conteo de clones por individuo

Después de la emergencia se colectaron los imagos en alcohol 70%; posteriormente se eligieron los adultos con alas silvestres y se les disectaron las alas para elaborar las preparaciones permanentes, en proporciones iguales de hembras y machos; las laminillas se prepararon colocando las alas en un portaobjetos con solución de Entellan® con un cubreobjetos y peso suficiente, por tres días, para aplanarlas. Se etiquetaron las preparaciones con un código que evitara el análisis prejuiciado de las manchas en las alas.

Las alas fueron analizadas usando un microscopio óptico a 40x, tanto en la superficie ventral como en la dorsal, registrándose el número y tipo de mancha o clones de células mutantes presentes (Graf *et al.*, 1984). Se contaron las manchas simples (clones *mwh* o clones *flr³*) o gemelas (clones *mwh* adyacentes a los clones *flr³*) (ver Anexo 4). Fueron revisados de 58 a 60 individuos por tratamiento, puesto que, de acuerdo con Frei y Würgler (1995), es recomendable un mínimo de 55 individuos para que los resultados sean estadísticamente significativos.

Estadístico SMART

Para determinar si los resultados de los diferentes tratamientos tienen significancia estadística se comparó la frecuencia de todos los tipos de manchas en las alas de las moscas que emergieron de los tratamientos y co-tratamientos vs el testigo correspondiente, de acuerdo con Graf *et al.* (1984); Frei y Würgler (1995). El análisis estadístico se realizó con el programa para PC SMART vs. 2, que evalúa con una regla de decisión múltiple basada en J_i^2 para proporciones (Frei y Würgler, 1988) a $p < 0.05$. Este análisis permite decidir si la frecuencia de manchas inducidas en los tratamientos indican resultados positivos, débiles positivos, negativos o indecisos basándose en las siguientes hipótesis:

- Hipótesis nula (Ho): Indica que la frecuencia de mutaciones inducidas y espontáneas de manchas/ individuo/ tratamiento no es significativamente mayor a la frecuencia del testigo negativo.
- Hipótesis alternativa (Ha): Señala que la frecuencia de las manchas/ individuo/ tratamiento inducidas sea “m” veces mayor que la frecuencia del testigo negativo (Graf et. al., 1984), donde “m”, es el factor de multiplicación el cual indica cuántas veces se incrementa el número de eventos de los tratamientos con respecto al testigo para considerar una respuesta positiva.

Para lo anterior se tiene que, las manchas pequeñas (1-2 células) son más comunes, por lo que su frecuencia es mayor a la de manchas grandes (más de 3 células) y manchas gemelas, así que en el software se analizan por separado para evitar una sobre estimación de la inducción de las manchas menos comunes. De esta manera, para considerar un incremento significativo en la frecuencia de manchas pequeñas y totales (que se obtiene de la suma de todas las manchas) se utiliza $m = 2$, mientras que para las manchas grandes y gemelas $m = 5$. Por ende son posibles las siguientes cuatro decisiones (Frei y Würigler, 1995):

- Aceptar Ho y rechazar Ha: negativo
- Rechazar Ho y aceptar Ha: positivo
- Rechazar Ho y rechazar Ha: indeciso
- Aceptar Ho y aceptar Ha: débil positivo

Los resultados débiles positivos e indecisos fueron analizados con la prueba no paramétrica U de Mann-Whitney-Wilcoxon la cual considera la variabilidad individual, en el programa STAT graphics versión 6.0 a $p < 0.05$ (Frei y Würigler, 1995).

Para determinar la diferencia estadística de la distribución del tamaño de los clones *mwh* se utilizó la prueba no paramétrica de Kolmogorov-Smirnov a $p < 0.05$

para medir el grado de concordancia entre dos distribuciones (Graf *et al.*, 1984), comparando las frecuencias acumuladas entre las distribución de clones *mwh* para los tratamientos vs. los testigos correspondientes.

Resultados y Discusión

Debido a que se ha reportado que el MMS causa bajos niveles de estrés oxidativo por la presencia de $\bullet\text{OH}$ y H_2O_2 , en respuesta al daño en el DNA (Rowe *et al.*, 2008), se propuso en este trabajo evaluar si el RES podría provocar una disminución en la genotoxicidad del MMS provocada por alquilación y/o estrés oxidativo, dadas las evidencias de su efecto antioxidante, antiproliferativo o apoptótico. En la Tabla I se presentan los resultados obtenidos después de analizar las frecuencias de manchas por individuos con los estadísticos descritos (Frei y Würigler, 1988, 1995).

Tabla I. Resumen de resultados obtenidos con SMART en ala de *Drosophila* en la progenie con fenotipo silvestre después de alimentar crónicamente larvas de (72 ± 4 h) con RES (2.5, 10, 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$), solo o en co-tratamiento con MMS (0.5 mM). Como testigos negativos se usaron EtOH 1% y Agua miliQ.

Tratamiento (Concentración) ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	No. de individuos	Manchas por individuo (número de manchas) diagnóstico estadístico*											
		Manchas pequeñas (1-2 células) m = 2		Manchas grandes (> 2 células) m = 5		Manchas gemelas m = 5		Manchas totales m = 2					
Cruza Estándar													
A													
EtOH 1%	58	0.76	(44)	0.05	(3)	0.00	(0)	0.81	(47)				
Agua	58	0.45	(26)	-	0.07	(4)	-	0.00	(0)	-	0.52	(30)	-
RES2.5	59	0.69	(41)	-	0.25	(15)	+	0.00	(0)	-	0.95	(56)	-
RES10	58	0.50	(29)	-	0.09	(5)	-	0.00	(0)	-	0.59	(34)	-
RES40	60	0.45	(27)	↓	0.10	(6)	-	0.00	(0)	-	0.55	(33)	-
B													
Agua	58	0.45	(26)		0.07	(4)		0.00	(0)		0.52	(30)	
EtOH 1%	58	0.76	(44)	+	0.05	(3)	-	0.00	(0)	-	0.81	(47)	+
C													
Agua/MMS	60	6.75	(405)		5.88	(353)		0.72	(43)		13.35	(801)	
EtOH/MMS	59	9.46	(558)	+	7.20	(425)	-	1.07	(63)	+	17.73	(1046)	+
D													
EtOH/MMS	59	9.46	(558)		7.20	(425)		1.07	(63)		17.73	(1046)	
RES2.5/MMS	59	8.41	(496)	-	6.10	(360)	-	0.92	(54)	-	15.42	(910)	-
RES10/MMS	60	8.90	(534)	-	7.58	(455)	-	1.22	(73)	-	17.70	(1062)	-
RES40/MMS	60	8.05	(483)	-	6.68	(401)	-	0.70	(42)	-	15.43	(926)	-

*Diagnóstico estadístico de acuerdo con Frei y Würigler (1988, 1995) comparados con su testigo correspondiente: -, negativo;+, positivo; ↓, disminución significativa, ($p < 0.05$); m, factor de multiplicación de riesgo mínimo para asignar un resultado positivo.

Testigos negativos (disolventes)

Al comparar los disolventes EtOH vs. Agua el resultado fue negativo para los tres tipos de manchas (Tabla 1-A), sin embargo al compararlos de manera inversa los resultados indicaron un efecto genotóxico del EtOH 1% evidenciado por el aumento en manchas pequeñas y totales (Tabla 1-B; Figura 6), este resultado coincide con los datos obtenidos por Gonthier y colaboradores (2012), quienes reportaron que el EtOH (20 mM) a una concentración menor a la utilizada en este estudio incrementa el estrés oxidativo y potencializa el daño al aumentar la concentración de ROS, obteniendo un aumento del daño genotóxico en cultivos de astrocitos de rata. Sin embargo, en estudios previos en SMART realizados en el Laboratorio de Genética Toxicológica de la FESI, el EtOH 1% no había presentado este efecto genotóxico; debido a que se trabajó bajo las mismas condiciones experimentales que en las ocasiones precedentes, con las mismas líneas, con el mismo protocolo de seguridad y con las mismas precauciones; además de que la concentración de EtOH 1% fue la misma y el mismo grado reactivo, este resultado resulta inexplicable por el momento. De igual manera, en la distribución del tamaño de los clones *mwh* hubo una diferencia significativa entre ambos disolventes, lo que indica que el EtOH 1% tuvo efecto sobre la división celular, con mayor número de manchas pequeñas que de acuerdo con Graf *et al.* (1984) son indicación de daño tardío o aneuploidía (Figura 7).

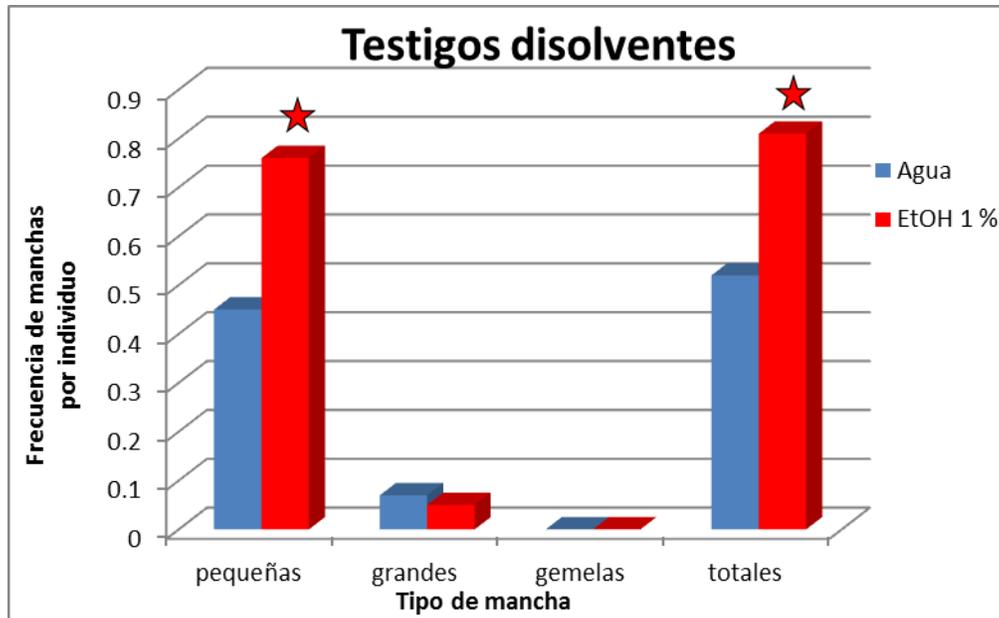


Figura 6. Frecuencia de manchas pequeñas, grandes, gemelas y totales por individuo de los testigos negativos ($p < 0.05$). Donde: (★) estadísticamente significativo.

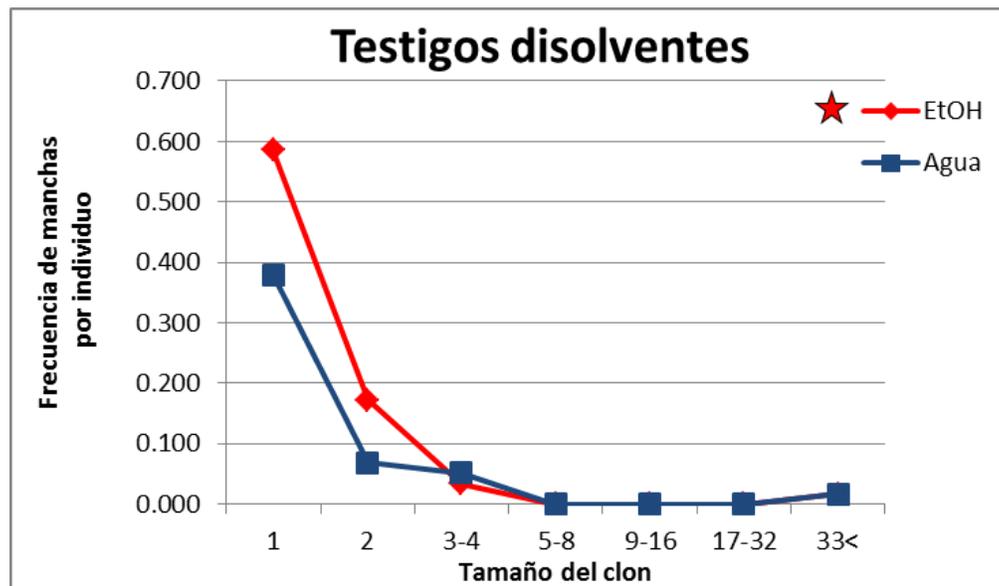


Figura 7. Distribución acumulada del tamaño de los clones *mwh* de los testigos negativos ($p < 0.05$). Las clases del tamaño de los clones *mwh* son: 1, 2, 3-4, 5-8, 9-16, 17-32, 33< células, que indican los eventos de división celular de los discos imaginales de las alas. Donde (★) estadísticamente significativo.

Testigos positivos (mutágeno + disolvente)

Al comparar los testigos EtOH/MMS vs. Agua/MMS se obtuvieron resultados débiles positivos (w) para manchas pequeñas, gemelas y totales los cuales fueron comprobados con la prueba no paramétrica U de Mann-Whitney-Wilcoxon, a $p < 0.05$ (Tabla 1-C). Por lo anterior, se demostró que al diluir el MMS con EtOH 1% aumentó el efecto genotóxico del alquilante (Figura 8), lo cual podría explicarse, por un efecto del disolvente, el cual presenta un carácter menos polar que el agua (polaridad del agua 10.2 vs. polaridad del EtOH 4.3) lo que permitiría que el EtOH hubiera facilitado la entrada de éste al interior de las células aumentando su biodisponibilidad; o bien, por un daño acumulado y provocado por ambos compuestos de manera independiente. Como se mostró anteriormente, el EtOH 1% también presentó actividad genotóxica, generando un aumento en la frecuencia de manchas, comparado con el Agua. Martin (2012) obtuvo un aumento semejante al usar acetona 2% como diluyente del MMS, lo que indica que la actividad genotóxica del MMS se ve afectada en gran medida por el disolvente utilizado, lo que puede potencializar el daño a las células producido por este agente, como demostraron Mangal y colaboradores (2009) con el DMSO. Sin embargo, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas al comparar entre sí la correspondiente distribución del tamaño de los clones *mwh* (Figura 9) por lo que se deduce que la división celular en los discos imaginales se comportó de manera similar bajo los tratamientos con cualquiera de los disolventes usados para administrar el MMS.

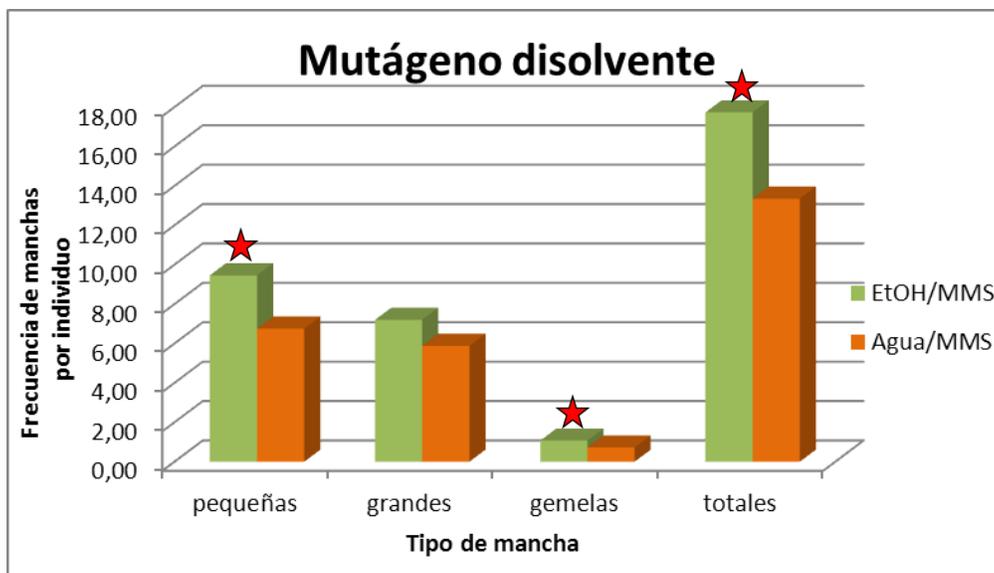


Figura 8. Frecuencia de manchas pequeñas, grandes, gemelas y totales por individuo de los testigos positivos ($p < 0.05$). Donde: (★) estadísticamente significativo.

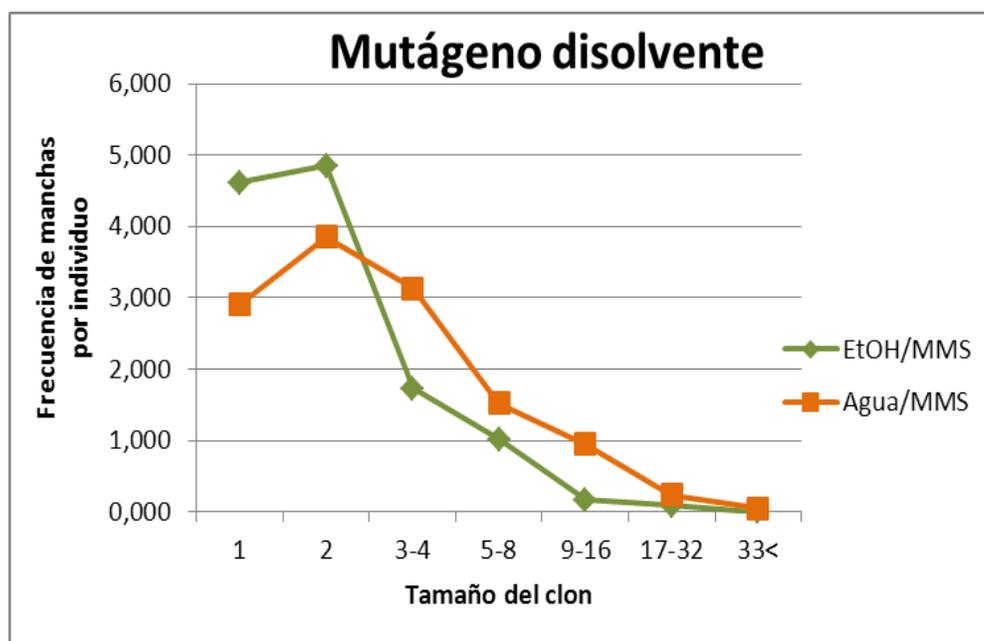


Figura 9. Distribución acumulada del tamaño de los clones *mwh* de los testigos positivos ($p < 0.05$). Las clases del tamaño de los clones *mwh* son: 1, 2, 3-4, 5-8, 9-16, 17-32, 33< células, que indican los eventos de división celular de los discos imaginales de las alas.

Tratamientos resveratrol

Al comparar los tres tratamientos RES (2.5, 10 y 40 µg/mL) con el testigo EtOH 1% (Tabla 1-A; Figura 10) se obtuvo que el tratamiento RES2.5, fue positivo para manchas grandes, lo que significa un daño temprano en las células de los discos imaginales de las alas (Graf *et al.*, 1984) que podría derivar de un efecto inicial pro-oxidante propiciado por dicha concentración, coincidiendo con lo propuesto por Alarcón y Villegas (2007) y Delmas *et al.* (2011), quienes reportan que el RES genera ROS como producto de su metabolismo (Figura 2, incisos b-e). Sin embargo, al hacer la comparación estadística con el programa SMART inverso con el testigo EtOH 1% vs. Tratamientos RES, se demostró que existe una tendencia dependiente de la dosis a disminuir las frecuencias de las manchas en RES2.5 y RES10, y sólo es significativa en el tratamiento RES40 para manchas pequeñas, lo cual no se reflejó para manchas totales (Tabla I-A). Esto de acuerdo con Graf *et al.* (1984) podría ser resultado de aneuploidías, del efecto tardío de uno o más metabolitos secundarios, del aumento de ROS o de un arresto del ciclo celular inducido por parte del RES como lo reportan en su momento, Bhardwaj y colaboradores (2007), Aggarwal y colaboradores (2004) y el equipo de Hsieh (2011), lo que hubiera evitado que la célula siguiera dividiéndose. También podría ser resultado de eventos apoptóticos, debidos al aumento en la concentración del RES, ya que éste puede tener mayor efecto a mayor concentración. Este efecto tardío coincidiría con Asensi y colaboradores (2002) quienes reportan que la capacidad anticancerígena potencial del RES está limitada por su baja biodisponibilidad.

También es probable que esta disminución en la frecuencia de manchas pequeñas tenga relación con sistemas de reparación del daño propios del organismo los cuales fueran inducidos por efecto del RES, como lo reportan Yun Lin y colaboradores (2011) y Hsieh y colaboradores (2011) quienes determinan la capacidad del RES de activar a p53, induciendo de esta forma la detención del ciclo celular (arresto) o apoptosis.

Sin embargo, también es posible que dicho efecto tardío no tuviera relación con la capacidad antioxidante del RES, ya que se ha reportado en modelos murinos, así como en estudios de farmacocinética en humanos, que el RES se metaboliza en menos de 8 h (Wenzel *et al.*, 2005; Cottar *et al.*, 2010, Delmas *et al.*, 2011), por lo que podría deberse a otras razones. Por último, se puede explicar dicha disminución por una alteración tardía en la dinámica de la división celular en los discos imaginales de las alas, ya que en los resultados de la comparación en la distribución acumulada del tamaño de los clones *mwh*, los tratamientos RES10 y RES40 fueron significativamente diferentes con respecto a la del testigo EtOH 1% (Figura 11).

Todo lo anterior, apoya la propuesta de un efecto apoptótico del RES, como ya se ha reportado en otros modelos (Cal *et al.*, 2003; Aggarwal *et al.*, 2004; Yun Lin *et al.*, 2011). Esto último no puede ser demostrado con este bioensayo, pero sugiere la pertinencia de evaluarlo en el futuro, bajo las mismas condiciones determinando la expresión de genes de apoptosis, como las *caspasas 9* y *3*.

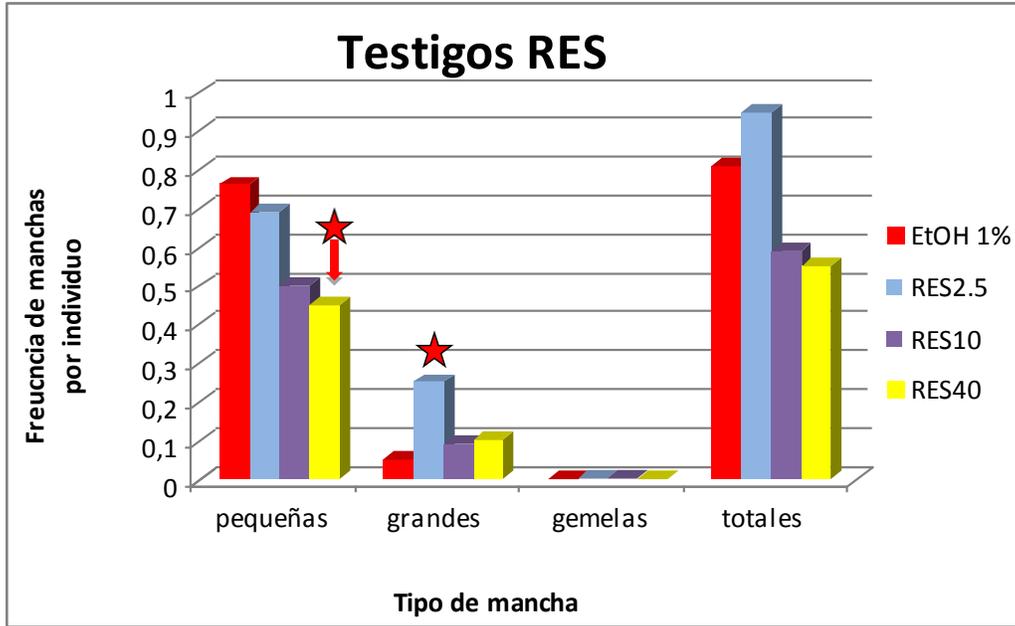


Figura 10. Frecuencia de manchas pequeñas, grandes, gemelas y totales por individuo de los tratamientos RES (2.5, 10 y 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$) comparados con el testigo negativo ($p < 0.05$). Donde: (★) estadísticamente significativo, (↓) estadísticamente significativo hacia abajo al hacer la comparación inversa.

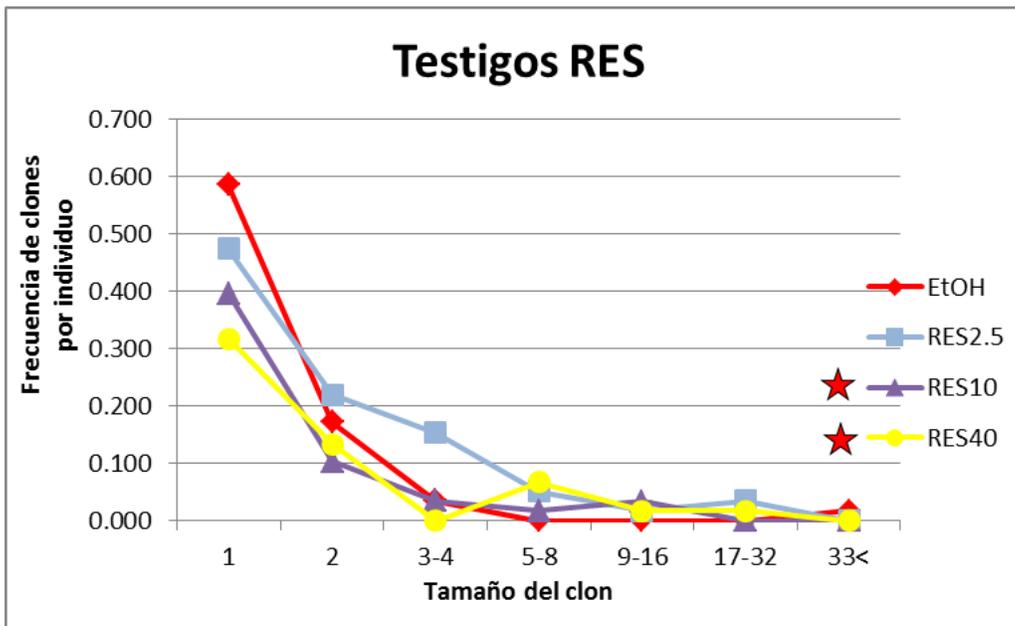


Figura 11. Distribución acumulada del tamaño de los clones *mwh* de los tratamientos RES (2.5, 10 y 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$) comparados con el testigo negativo EtOH 1% ($p < 0.05$). Las clases del tamaño de los clones *mwh* son: 1, 2, 3-4, 5-8, 9-16, 17-32, 33< células, que indican los eventos de división celular de los discos imaginales de las alas. Donde: (★) estadísticamente significativo.

Co-tratamientos RES/MMS

Al comparar las frecuencias de las manchas y la distribución de los clones *mwh* entre los co-tratamientos RES (2.5, 10 y 40 µg/mL)/MMS y el testigo EtOH/MMS (Tabla 1-D; Figuras 12 y 13), no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre ninguna concentración y para ningún tipo de mancha. Por lo tanto, no se demuestra efecto alguno por parte del RES, a las concentraciones utilizadas, con respecto al efecto del MMS. Estos resultados no concuerdan con los obtenidos por Fu y colaboradores (2004) quienes demostraron en la prueba de Ames que el RES pudo suprimir la inducción de mutaciones inducidas por el MMS. Por el contrario, Langová y colaboradores presentan resultados parecidos en estudios de genotoxicidad *in vitro* utilizando la prueba de Ames (que trabaja con *Salmonella typhimurium* que es un organismo procarionte, unicelular carente de metabolismo xenobiótico a diferencia de *D. melanogaster* que es un organismo eucarionte pluricelular con metabolismo xenobiótico propio) donde se señala que el RES tuvo efecto significativo solamente contra los mutágenos indirectos aflatoxina B1 (AFB₁), 2-amino-3-metilimidazolquinolina (IQ). Sin embargo, para el mutágeno directo que utilizaron, N-nitroso-N-metilurea (MNU), no hubo efecto del RES, coincidiendo con este trabajo. Dado que el MMS también actúa de manera directa, en este bioensayo el RES no contrarrestó el efecto genotóxico de este mutágeno, ni su efecto oxidante indirecto.

Dado lo anterior, se propone que si el RES tiene efecto antigenotóxico, como lo sugieren los resultados de los tratamientos RES10 y RES40 (Figura 10 y 11), éste no fue suficiente para contrarrestar los efectos genotóxicos que se derivaron del tratamiento con el MMS. Asumiendo un rápido metabolismo del RES que hubiera tenido efecto al inicio del tratamiento, se habría encontrado una disminución significativa de las manchas grandes que fuera dependiente de la concentración. Esto último no se obtuvo para los cotratamientos con MMS, donde se esperaba un comportamiento similar al que se observa con los tratamientos RES donde se ve una tendencia a disminuirlas (Tabla I-A). La hipótesis de protección del RES al

efecto del MMS tendría que ser demostrado con otro bioensayo donde se demostrara un efecto protector contra el daño directo producido por el MMS y su consecuente producción de ROS.

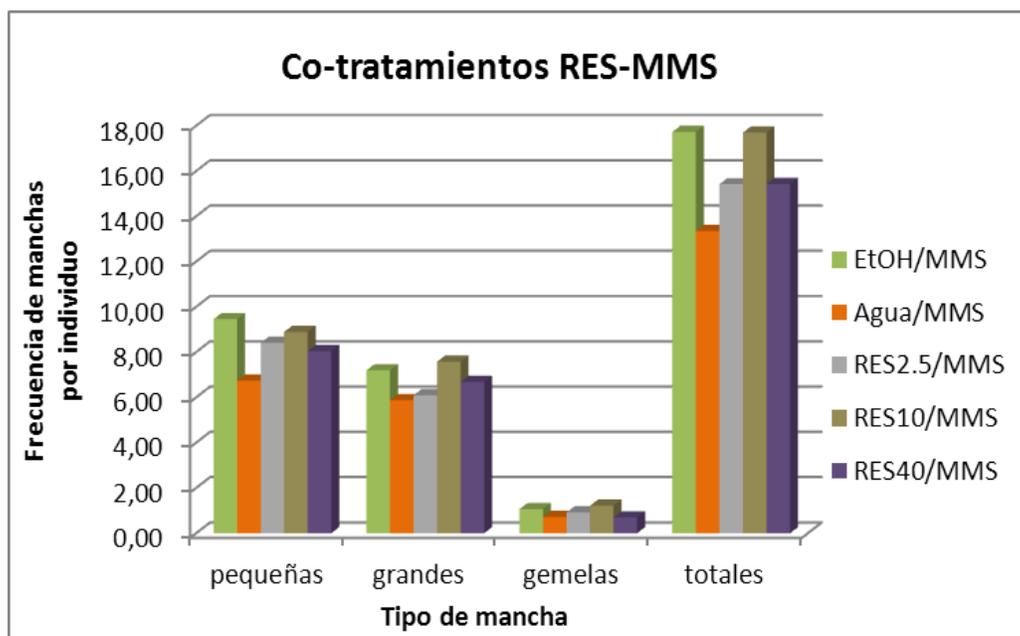


Figura 12. Frecuencia de manchas pequeñas, grandes, gemelas y totales por individuo de los co-tratamientos RES/MMS (2.5, 10 y 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$) comparadas con el testigo EtOH/MMS ($p < 0.05$).

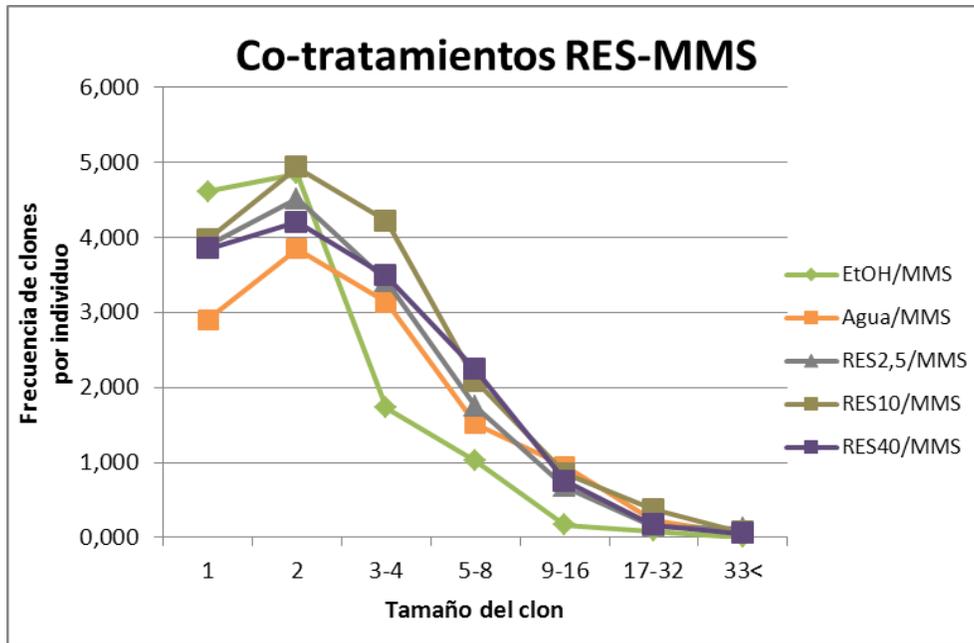


Figura 13. Distribución acumulada del tamaño de los clones *mwh* de los co-tratamientos RES/MMS (2.5, 10 y 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$) comparadas con el testigo EtOH/MMS ($p < 0.05$). Las clases del tamaño de los clones *mwh* son: 1, 2, 3-4, 5-8, 9-16, 17-32, 33< células, que indican los eventos de división celular de los discos imaginales de las alas.

Todo lo anterior indica que si bien, el RES no presentó algún tipo de efecto protector, tampoco provocó un aumento al administrarse junto con un compuesto genotóxico. Para explicar lo anterior se considera que el potencial antígeno tóxico del RES se ve altamente afectado por su biodisponibilidad en el organismo, puesto que es dependiente de la dosis y del disolvente utilizado, ya que la mayor cantidad de estudios utilizan como principales solventes el dimetil sulfóxido (DMSO) y el EtOH 0.025 a 0.1% lo cuales favorecen la distribución y biodisponibilidad del trans-resveratrol y cis-resveratrol; sin embargo, el EtOH disminuye la capacidad antiproliferativa del RES, aunque no inhibe el efecto en contra de la proliferación de células cancerosas (Delmas *et al.*, 2011). Como se comentó anteriormente, el efecto del RES en modelos *in vitro* ha comprobado su potencial como antioxidante y antiproliferativo; los resultados de este trabajo *in vivo*, coinciden con parte de los resultados de Sloan y colaboradores (2012). Estos autores evaluaron el efecto antitumoral del RES en modelos de cáncer de ovario NuTu-19 *in vitro*, obteniendo

resultados positivos y con los mismos parámetros en modelos de rata *in vivo* no observaron ningún efecto aparente del RES. Lo que sugiere que, si bien, el RES es ampliamente conocido por sus propiedades antioxidantes, antimutagénicas y antiproliferativas que ha presentado en modelos *in vitro*, dichas propiedades pueden variar en modelos *in vivo*, donde no se toman en cuenta todos los procesos biológicos a los que están sometidos los compuestos *in vivo* tales como el metabolismo o los procesos homeostáticos propios de los organismos. En este trabajo se propone que quizá por esta razón el efecto del RES no presentó disminución del daño genotóxico producido por el MMS. Aunado a lo anterior, diversos estudios han reportado que el RES presenta múltiples moléculas blanco, además de que es capaz de activar múltiples vías de transducción de señales y desembocar diferentes tipos de respuesta, lo que podría haber reducido la probabilidad de que pudiera contrarrestar el daño producido por el MMS.

Por lo anterior, son recomendables más estudios encaminados al ámbito de la quimioprevención, los cuales además de ayudarnos a conocer el efecto y la forma en que actúan los compuestos en sistemas *in vitro*, también nos ayuden a entender el papel que juegan estos últimos compuestos en modelos *in vivo*, para que de esta manera puedan ser aplicados de forma segura y confiable en las poblaciones humanas. Por ello con respecto a este trabajo es recomendable continuar con más investigaciones, utilizando los mismos parámetros pero aumentando las concentraciones, lo que nos permitiría demostrar con claridad si verdaderamente el RES es capaz de inhibir la acción de este tipo de compuestos genotóxicos y si dichas concentraciones pueden presentar efectos genotóxicos en modelos *in vivo*.

Conclusiones

- El resveratrol no disminuyó ni aumentó el daño producido por el MMS en la Cruza Estándar de la prueba en ala (SMART) en *Drosophila melanogaster* con ninguna de las concentraciones utilizadas.
-
- Los tratamientos RES/MMS no modificaron la división celular en las células de los discos imaginales del ala de *D. melanogaster*, en ninguna de las concentraciones utilizadas.
- El tratamiento RES2.5 provocó un aumento en la frecuencia de manchas grandes, por lo cual se le atribuye un efecto genotóxico temprano, que podría deberse a un efecto pro-oxidante.
- El tratamiento RES40 provocó una disminución en la frecuencia de manchas pequeñas con respecto a la tasa espontánea de mutación y recombinación.
- Los tratamientos RES10 y RES40 tuvieron efecto en la distribución del tamaño de los clones *mwh*, lo cual indica una modulación en el ciclo celular, lo que podría deberse a un efecto apoptótico en las células de los discos imaginales de las alas.
- El MMS causó mayor daño genotóxico al disolverlo en EtOH 1%.

Referencias

- Aggarwal, B.B., Bhardwaj, A., Aggarwal, R.S., Seeram, N.P., Shishodia, S., Takada, Y. 2004. Role of resveratrol in prevention and therapy of cancer: preclinical and clinical studies. *Anticancer Res* **24**: 2783-840.
- Alarcón, C.L., Villegas I. 2007. Resveratrol as an antioxidant and pro-oxidant agent: mechanisms and clinical implications. *Biochem. Soc. Trans.* **35**: 1156-1160.
- Anzenbacher, P., Anzenbacherová, E. 2001. Cytochromes P450 and metabolism of xenobiotics. *Cell Mol. Life. Sci.* **58**: 737-747.
- Arista, D.D. 2008. Evaluación de la interacción del MMS, FeSO₄ y vitamina C con la prueba SMART en ala de *Drosophila melanogaster*. Tesis de Licenciatura (Biología). FES Iztacala. UNAM. México.
- Asensi, M., Medina, I., Ortega, A., Carretero, J., Baño, M.C., Obrador, E., Estrela, J.M. 2002. Inhibition of cancer growth by resveratrol is related to its low bioavailability. *Free Radic. Biol. Med.* **33**(3): 387–398.
- Athar, M., Back, J.H., Tang, X., Kwang, H.K., Levy, K., Bickers, D.R., Kim, A.L. 2007. Resveratrol: A review of preclinical studies for human cancer prevention. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **224**: 274–283.
- Barret, J.C. 2000. Molecular and environmental causes of cancer. *Drug Metab. Rev.* **139**: 121-124.
- Baur, J.A., Sinclair, D.A. 2006. Therapeutic potential of resveratrol: the *in vivo* evidence. *Nat. Rev. Drug Discov.* **5**: 493-506.

Benezer, M.B., Mercado, E.C., García, E.P. 2008. La producción de especies reactivas de oxígeno durante la expresión de la resistencia a enfermedades en plantas. *Rev. Mex. Fitopatol.* **26**(1): 56-61.

Beranek, D.T. 1990. Distribution of methyl and ethyl adducts following alkylation with monofunctional alkylating agents. *Mutat. Res.* **231**: 11-30.

Bhardwaj, A., Sethi, G., Vadhan-Raj, S., Bueso-Ramos, C., Takada, Y., Gaur, U., Nair, A.S., Shishodia, S., Aggarwal, B.B. 2007. Resveratrol inhibits proliferation, induces apoptosis, and overcomes chemoresistance through down-regulation of STAT3 and nuclear factor-kappaB-regulated antiapoptotic and cell survival gene products in human multiple myeloma cells. *Blood* **109**: 2293-2302..

Boveris, A. 2005. La evolución del concepto de radicales libres en biología y medicina. *Ars. Pharm.* **46** (1): 85-95.

Boyce, A.P., Gooderham N.J. 2000. Treatment of mice with the phytoalexin resveratrol inhibits hepatic CYP1A2 mediated metabolism. *Toxicol. Lett.* **116** (1): 81.

Brodská, B., Holoubek, A. 2011. Generation of reactive oxygen species during apoptosis induced by DNA-damaging agents and/or histone deacetylase inhibitors. *Oxid. Med. Cell Longev.* **7**: 1-7.

Brooks C.L., Gu W. 2009. How does SIRT1 affect metabolism, senescence and cancer. *Nat. Rev. Cancer.* **9**: 123-128.

Cal, C., Garban, H., Jazirehi, A., Yeh, C., Mizutani, Y., Bonavida, B. 2003. Resveratrol and cancer: chemoprevention, apoptosis, and

chemoimmunosensitizing activities. *Curr. Med. Chem. Anticancer Agents* **3**: 77-93.

Castell, J.V. 2005. Metabolismo de fármacos y hepatotoxicidad. *Rev. Toxicol.* **13**: 1007-1024.

Celis, L.G., Rozo, C., Garay, J., Vargas, D., Lizcano, F. 2008. Efecto lipolítico del resveratrol en células 3T3-L1. *Salud Uninorte* **24**: 165-171..

Celniker, S.E., Rubin, G.M. 2003. The *Drosophila melanogaster* genome. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* **4**: 89-117.

Cottart, C.H., Antoine, V.N., Morizot, C.L., Beaudeau, J.L. 2010. Resveratrol bioavailability and toxicity in humans. *Mol. Nutr. Food Res.* **54**: 7-16.

Daborn, P.J., Yen, J.L., Bogwitz, M.R., Le Goff, G., Feil, E., Jeffers, S., Tijet, N., Perry, T., Heckel, D., Batterham, P., Feyereisen, R., Wilson, T.G., Constant, R.H. 2002. A single p450 allele associated with insecticide resistance in *Drosophila*. *Science.* **27**(297):2253-2256.

De Salvia, R., Festa, F., Ricordy, R., Perticone, P., Cozzi, R. 2002. Resveratrol affects in a different way primary versus fixed DNA damage induced by H₂O₂ in mammalian cells *in vitro*. *Toxicol. Lett.* **135**: 1–9

Delaporte, E., Wilkinson G.R. 1998. Modulation of cytochrome P450 enzyme activity by resveratrol. *Clin. Pharmacol. Ther.* **63**: 149.

Delmas, D., Aires, V., Limagne, E., Dutartre, P., Mazue, F., Ghiringhelli, F., Latruffe, N. 2011. Transport, stability, and biological activity of resveratrol. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **1215**: 48–59.

Dueñas, I.E., Heres, M.E., Castañeda, P.L., Graf U. 2001. Easy rising of *Drosophila melanogaster* consisting of mashed potato flakes and a preservative food. *Dros. Inf. Serv.* **84**: 166.

Edwards, J.A., Beck, M., Riegger, C., Bausch J. 2011. Safety of resveratrol with examples for high purity, trans-resveratrol, resVida®. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **1215**: 131–137.

FlyBase. National Human Genome Research Institute, U.S. National Institutes of Health. [En línea fecha de acceso 8 de septiembre del 2012], disponible en: <http://www.flybase.bio.idiana.edu>

Forrest, I.R. 2012. Examining the relationship between diet-induced acidosis and cancer. *Nutr. Metab.* **9**: 72-78.

Frei, H. Würgler, F.E. 1988. Statistical methods to decide whether mutagenicity test data from *Drosophila* assays indicate a positive, negative, or inconclusive result. *Mutat. Res.* **203**: 297-308.

Frei, H., Würgler, F.E. 1995. Optimal experimental design and sample size for the statistical evaluation of data from Somatic Mutation and Recombination Test (SMART) in *Drosophila*. *Mutat. Res.* **334**: 247-258.

Fu, Z.D., Cao, Y., Wang, K.F., Xu, S.F., Han, R. 2004. [Chemopreventive effect of resveratrol to cancer]. *Ai Zheng* **23**: 869–873.

Drosophila Genetics and Epigenetics. [En línea desde 26 Agosto del 2012] [Fecha de acceso 9 de septiembre del 2012], disponible en: <http://184.73.223.226/GEDlab/>

Gonthier, B., Allibe, N., Rousselle, C.C., Lamarche, F., Nuiry, L., Barret, L. 2012. Specific Conditions for Resveratrol Neuroprotection against Ethanol-Induced Toxicity. *J. Toxicol.* **2012**. 1-11.

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

Graf, U., Abraham, S.K., Guzmán, J.R., Würgler, F.E. 1998. Antigenotoxicity studies in *Drosophila melanogaster*. *Mutat. Res.* **402**: 203–209.

Guzmán, R.J., Graf, U. 1995. *Drosophila melanogaster* somatic mutation and recombination test as a biomonitor. *Mutat. Res.* **12**: 169-181.

Haliwell B. 2006. Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiol.* **141**: 312-322.

Held, P.P. 2010. An introduction to reactive oxygen species- measurement of ROS in cells. *Bio. Tek.* **3**: 1-10.

Hsieh, T.C., Wong, C., John, B.D., Wu, J.M. 2011. Regulation of p53 and cell proliferation by resveratrol and its derivatives in breast cancer cells: an in silico and biochemical approach targeting integrin $\alpha\beta3$. *Int. J. Cancer.* **129**(11): 2732-2743.

James, W.D., Baker, T.A., Bell, S.P., Gunn, A., Levin, M., Losick, R. 2005. *Biología Molecular del Gen*, Buenos Aires, Madrid; 5ª edición, Editorial Panamericana. 762 pp.

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

Kang, M.A., So, E.Y., Simons, A.L., Spitz, D.R., Ouchi, T. 2012. DNA damage induces reactive oxygen species generation through the H2AX-Nox1/Rac1 pathway. *Cell Death Dis.* **3**(249): 1-8.

King, R.E., Bomser, J.A., Min D.B. 2006. Bioactivity of resveratrol. *Comprehensive Rev. Food Sci. Food Safety.* **5**: 65-70.

Langová, M., Polívková, Z., Šmerák, P., Bártová, J., Bárta, I. 2005. Antimutagenic effect of resveratrol. *Czech J. Food Sci.* **23**: 202–208.

Lee, M.Y., Kim, M.A., Kim, H.J., Bae, Y.S., Park, J.I., Kwak, J.Y., Chung, J.H., Yun, J. 2007. Alkylating agent methyl methanesulfonate (MMS) induces a wave of global protein hyperacetylation: Implications in cancer cell death. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **360**: 483–489.

Lin, J.K., Tsai, S.H. 1999. Chemoprevention of cancer and cardiovascular disease by resveratrol. *Proc. Natl. Sci. Counc. Roc.* **23**(3): 99-106.

Loeb, K.R., Loeb, L.A. 2000. Significance of multiple mutations in cancer. *Carcinogenesis* **21**: 379-385.

Lozada, S.M., García, L. 2009. Oxidative stress and antioxidants: how to keep the balance. *Rev. Asoc. Colomb. Dermatol.* **17**: 172-179.

Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémésy, C., Jiménez, L. 2006. Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am. J. Clin. Nutr.* **79**: 727–747.

Mangal, D., Vudathala, D., Park, J.H., Lee, S.H., Penning, T.M. Blair, I.A. 2009. Analysis of 7,8-Dihydro-8-oxo-2'-deoxyguanosine in cellular DNA during oxidative stress. *Chem. Res. Toxicol.* **22**: 788-797.

Maréchal, J.D., Kemp, C.A., Roberts, G.C., Paine, M.J., Wolf, C.R., Sutcliffe, M.J. 2008. Insights into drug metabolism by cytochromes P450 from modelling studies of CYP2D6-drug interactions. *Br. J. Pharmacol.* **153**(1): 82–89.

Martín, H.C. 2012. Evaluación del daño producido por el Metilmetanosulfonato, en larvas de *Drosophila melanogaster* (Cruza E) pretratadas con licopeno, mediante SMART en ala. Tesis de Licenciatura (Biología). FES Iztacala. UNAM. México.

Martínez, P.I. 2000. Quimioprevención del cáncer. *Rev. Cubana Oncol.* **16**: 67-71.

Matsuoka, A., Furuta, A., Masayasu, O., Fukuhara, K., Miyata, N. 2001. Resveratrol, a naturally occurring polyphenol, induces sister chromatid exchanges in a Chinese hamster lung (CHL) cell line. *Mutat. Res.* **494**:107-113.

Millán, F.P., Serrano, G.S., Expósito M.I. 2008. Resveratrol, nuevos retos en el tratamiento antienvjecimiento. Hospital Arnau de Vilanova. 66-70.

Murias, M., Jäger, W., Handler, N. 2005. Antioxidant, prooxidant and cytotoxic activity of hydroxylated resveratrol analogues: structure-activity relationship. *Biochem. Pharmacol.* **69**: 903–912.

Nakagawa, H., Kiyozuka Y., Uemura Y., Senzaki H., Shikata N., Hioki K., Tsubura A.. 2001. Resveratrol inhibits human breast cancer cell growth and may mitigate the effect of linoleic acid, a potent breast cancer cell stimulator. *J Cancer Res. Clin. Oncol.* **127**: 258-264.

Namasivayam, N. 2011. Chemoprevention in experimental animals. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **1215**: 60–71.

Omiecinski, C.J., Heuvel, J.P., Perdew, G.H., Peters, J.M. 2011. Xenobiotic Metabolism, Disposition, and Regulation by Receptors: From Biochemical Phenomenon to Predictors of Major Toxicities. *Toxicol. Sci.* **120**(1): 49–75.

Opara E. 2006. Oxidative stress. *Dis. Mon.* **52**: 183-198.

Pandey, U.B., Nichols, C.D. 2011. Human disease models in *Drosophila melanogaster* and the role of the fly in therapeutic drug discovery. *Pharmacol Rev.* **63**: 411–436.

Plant, N. 2003. Molecular Toxicology. Bios Sci. Pub., London, 145 pp.

Rebbeck, T.R. 1997. Molecular epidemiology of the human glutathione S-transferase genotypes GSTM1 and GSTT1 in cancer susceptibility. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* **6**(9): 733-743.

Franke.S.I.R, Prá, D., Erdtmann, B., Pégas, H.J., Da Silva, J. 2005. Influence of orange juice over the genotoxicity induced by alkylating agents: an *in vivo* analysis. *Mutagenesis* **20**(4): 279-283.

Rowe, A. L., Degtyareva, N., Doetsch, W. P. 2008. DNA damage-induced reactive oxygen species (ROS) stress response in *Saccharomyces cerevisiae*. *Free Radic. Biol. Med.* **45**: 1167–1177.

Sakihama, Y., Cohen, M.F., Grace, S.C., Yamasaki, H. 2002. Plant phenolic antioxidant and prooxidant activities: phenolics-induced oxidative damage mediated by metals in plants. *Toxicology* **177**: 67–80.

Sánchez, S.A. 2006. Valoración del efecto genotóxico del co-tratamiento metil metanosulfonato y sulforafano en *Drosophila melanogaster* mediante SMART en ala. Tesis de Licenciatura (Biología). FES Iztacala. UNAM. México.

Seeram, N.P., Kulkarni, V.V., Padhye, S. 2006. Sources and chemistry of resveratrol. En: Resveratrol in health and disease. Aggarwal B.B. and Shishodia S. eds. Taylor & Francis, Boca Raton. 17-32.

Sgambato, A., Ardito, R., Faraglia, B., Boninsegna, A., Wolf, F.I., Cittadini, A. 2001. Resveratrol, a natural phenolic compound, inhibits cell proliferation and prevents oxidative DNA damage. *Mutat. Res.* **496**(2): 171-180.

Siddique, H.R., Chowdhuri, D.K., Saxena, D.K., Dhawan, A. 2005. Validation of *Drosophila melanogaster* as an in vivo model for genotoxicity assessment using modified alkaline Comet assay. *Mutagenesis* **20**(4): 285-290.

Sloan, K.S., Sloan, T., Blanco, D., Marcanthony, S., Booth, T.D., Bishayee, A. 2012. Resveratrol Exerts Differential Effects *in vitro* and *in vivo* against Ovarian Cancer Cells. *Asian Pacific J. Cancer Prev.* **13**: 1333-1340.

Stivala, L.A., Savio, M., Carafoli, F., Perucca, P., Bianchi, L., Maga, G., Forti, L., Pagnoni, U.M., Albinii, A., Prospero, E., Vannini, V. 2001. Specific structural determinants are responsible for the antioxidant activity and the cell cycle effects of resveratrol. *J. Biol. Chem.* **276**: 22586–22594.

Surh, J.I. 1999. Molecular mechanisms of chemopreventive effects of selected dietary and medicinal phenolic substances. *Mutat. Res.* **428**: 305-327.

Szekeres, T., Saiko, P., Fritzer, S.M., Djavan, B., Jäger, W. 2011. Chemopreventive effects of resveratrol and resveratrol derivatives. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **1215**: 89–95.

Tao, K.S., Urlando, C., Heddle, J.A. 1993. Mutagenicity of methyl methanesulfonate (MMS) *in vivo* at the Dlb-1 locus and a lacI transgene. *Environ. Mol. Mutagen.* **22**: 293–296.

Uenobe, F., Nakamura, S., Miyazawa, M. 1996. Antimutagenic effect of resveratrol against Trp-P-1. *Mutat. Res.* **373**: 197–200.

Ungvari, Z., Orosz, Z., Rivera, A., Labinsky, N., Xiangmin, Z., Olson, S., Podlutzky, A., Csiszar, A. 2007. Resveratrol increases vascular oxidative stress resistance. *AJP-Heart Circ. Physiol.* **292**: 2417- 2424.

Wang, D., Hanga, T., Wu, C., Liu, W. 2005. Identification of the major metabolites of resveratrol in rat urine by HPLC-MS/MS. *J. Chromatogr. A* **829**: 97–106.

Wang, L.X., Heredia, A., Song H., Zhang, Z., Yu, B., Davis C., Redfield, R. 2004. Resveratrol glucuronides as the metabolites of resveratrol in humans: characterization, synthesis, and anti-HIV activity. *J. Pharm. Sci.* **93**: 2448- 2457.

Wei Y., Yu-Cai F., Wei W. 2012. Cellular and molecular effects of resveratrol in health and disease. *J. Cell. Biochem.* **113**: 752-759.

Wenzel, E., Somoza, V. 2005. Metabolism and bioavailability of trans-resveratrol. *Mol. Nutr. Food Res.* **49**: 472-481.

Winterbourn, C. 2009. Pro-oxidants or antioxidants. *Free Radic. Biol. Med.* **14**: 85-90.

Yan, Y., Yang, J., Chen, G., Mou, Y., Zhao, Y., Pan, L., Ma, C., Liu, X., Wu, C. 2011. Protection of resveratrol and its analogues against ethanol-induced

oxidative DNA damage in human peripheral lymphocytes. *Mutat. Res.* **721**: 171-177.

Yu, C., Shin, Y.G., Chow, A., Li, Y., Kosmeder, J.W., Yong, S.L., Hirschelman, W.H., Pezzuto, J.M., Rajendra, G.M., van Breemen, R.B. 2002. Human, rat, and mouse metabolism of resveratrol. *Pharm. Res.* **19**: 1907-1914.

Yu, W., Fu, Y.C., Wang, W. 2012. Cellular and molecular effects of resveratrol in health and disease. *J. Cell Biochem.* **113**(3): 752-759.

Yun Lin, H., Tang, H.Y., Davis F.B., Davis, P.J. 2011. Resveratrol and apoptosis. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **1215**: 79–88.

Zhu, Y., Chiang, H., Zhou, J., Kissinger, P.T., 2005. In vitro metabolism study of resveratrol and identification and determination of its metabolite piceatannol by LC/EC and LC/MSMS. *Asian J. Drug Metabol. Pharm.* **5**: 49-54

Anexos

Metabolismo de xenobióticos

Los organismos están expuestos a diferentes sustancias químicas externas denominadas xenobióticos, que una vez que el organismo se expone a ellas pueden amenazar su equilibrio funcional. En general, los compuestos pueden ser absorbidos por difusión a través de la piel, o atravesar la membrana de las células pulmonares o del tracto gastrointestinal. La constante exposición a este tipo de sustancias, de origen ajeno al organismo (xenobióticas), podría resultar en una acumulación dentro del mismo, a menos que se presente un sistema eficaz que pueda metabolizarlas y posteriormente eliminarlas. Para que una sustancia xenobiótica pueda ser eliminada del organismo se requiere, en primera instancia, que sea soluble en agua, para que de esta forma pueda ser expulsada por medio de la orina, el sudor y las heces, que son las rutas de eliminación más frecuentes en vertebrados (Omićinski *et al.*, 2011). Sin embargo, algunos compuestos hidrosolubles que se encuentran en los fluidos de excreción pueden ser difundidos nuevamente hacia las membranas de algunos tejidos y en consecuencia sus metabolitos secundarios pueden ser reabsorbidos por el organismo, lo que dejaría aparentemente una acumulación de ellos dentro del mismo. Si la concentración dentro del organismo es excesiva, conllevará un riesgo para las funciones de las biomoléculas que actúen en su entorno, lo que resultaría en un mal funcionamiento de un órgano, tejido, sistema, etc., a su vez interfiriendo en las reacciones bioquímicas que en ellos ocurren (Castell, 2005).

Los organismos tienen un sistema metabólico eficaz que convierte las sustancias xenobióticas hidrofóbicas en metabolitos hidrosolubles capaces de ser excretados por las vías de eliminación. A esta actividad bioquímica se le denomina metabolismo xenobiótico, el cual se ha dividido a su vez en tres grandes grupos de

actividad enzimática: reacciones de Fases I, II y III (Omiecinski *et al.*, 2011) (Figura 14).

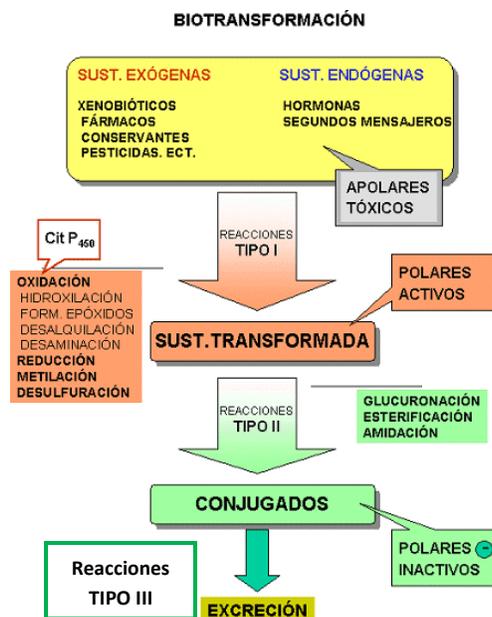


Figura 14. Reacciones del metabolismo xenobiótico

En general las reacciones de la FASE I, modifican la estructura química de la molécula, por introducción de grupos funcionales como son el hidroxilo, el amino y el carboxilo, entre otros, haciéndola más polar. La oxidación es la reacción más importante de la FASE I sin embargo, también se puede obtener una mayor polaridad de la sustancia xenobiótica por procesos de hidrólisis. En general estas reacciones están mediadas por un sistema de oxidación compuesto principalmente por una familia de enzimas mono-oxigenasas denominadas citocromos P450 (*CYP450s*) (Maréchal *et al.*, 2008), la cual requiere del cofactor NADPH como donador inicial de electrones y oxígeno molecular como oxidante (Anzenbacher y Anzenbacherová, 2001).

Las reacciones de la FASE II, se conocen como de conjugación, puesto que involucran la adición de grupos endógenos que generalmente son de carácter polar, y se encuentran altamente disponibles por parte del organismo,

confiriéndole de esta forma un carácter más hidrosoluble a las sustancias xenobióticas (Plant, 2003). Estos grupos endógenos son adicionados a los grupos funcionales de las sustancias xenobióticas que fueron transformadas en la FASE I. Los resultados finales son moléculas polares y de carácter hidrosoluble, lo que facilita su excreción al disminuir su carácter hidrofóbico. Este tipo de reacciones metabólicas requieren de un gasto energético mayor para la formación de los enlaces químicos; por lo cual, aparte de requerir de ciertos cofactores que permitan la conjugación, también es necesario el uso de moléculas de alta energía, como el ATP (Rebbeck, 1997).

Después de las reacciones de FASE II, los conjugados de xenobióticos pueden sufrir aún más modificaciones, estos compuestos pueden ser hidrolizados o sufrir más modificaciones (Plant, 2003). En la FASE III del metabolismo los conjugados y sus metabolitos pueden ser excretados desde las células, con los grupos aniónicos actuando como marcadores de afinidad para una serie de transportadores de membrana, éstas proteínas son miembros de la familia de transportadores transmembrana que unen ATP y pueden catalizar el transporte dependiente de ATP de una estrecha variedad de aniones hidrofóbicos, y así actuar para extraer productos de la fase II hacia el medio extracelular, donde pueden ser posteriormente metabolizados o excretados (Maréchal *et al.*, 2008).

Prueba SMART en ala

La prueba de mutación y recombinación somáticas (SMART) ha brindado grandes ventajas puesto que se trata de un ensayo que evalúa una sola generación *in vivo*, utilizando marcadores recesivos que se expresan en la superficie de los ojos o de las alas de las moscas adultas (Graf *et al.*, 1998). Según lo propuesto por Graf *et al.* (1984) “esta técnica se basa en la pérdida de heterocigosis de genes marcadores mediante un tratamiento con compuestos genotóxicos que afecta directamente a las células de los discos imaginales de las larvas, los cuales conducen a la formación de un clon de células mutadas que después de la eclosión del imago se expresan como manchas en los ojos o en las alas”

En el ensayo en ala se utilizan dos marcadores que afectan a los tricomas del ala: *mwh* (*multiple wing hair*) que es una mutación recesiva homocigótica viable, localizada en el brazo izquierdo del cromosoma 3 (3-0.3), el marcador *mwh* determina la presencia de más de un tricoma por células en las alas; y el marcador *flr³* (*flare*) que es una mutación recesiva que afecta la forma de los tricomas, localizado en el brazo izquierdo del cromosoma 3 (3-3.38), el marcador *flare* provoca la alteración del mismo, dándole un aspecto de flama o roseta.

Las líneas flare y Oregón-flare también presentan el marcador *Beaded Serratia* (*Bd⁶*), que es un marcador dominante que en condición homocigota es letal, se localiza en el cromosoma 3 (3-92.5), se expresa con el fenotipo alas aserradas y se utiliza para reconocer a las líneas. Además cuentan con las inversiones In(3LR)TM3 (Inversión (3 left, right) Third Multiple 3), que presenta tres inversiones, dos paracéntricas (L y R) y una pericéntrica (L+R), que es un cromosoma balanceador de los marcadores *flare³* y *Bd⁶*, e impide recuperar eventos no deseables, producto de la recombinación meiótica y permiten mantener las líneas con los marcadores letales en heterocigosis (Graf *et al.*, 1998).

Además de los marcadores mencionados (todos localizados en el cromosoma 3) para la línea Oregon-flare ésta presenta los cromosomas 1 y 2 de la línea Oregon Resistent *OR(R)* resistente a pesticidas. Donde se localizan los genes *Cyp6a8* y *Cyp6a9* (cromosoma 1) y *Rst(2)DDT* (*Cyp6g1*) y *Cyp6a2* (cromosoma 2) relacionados con el metabolismo xenobiótico; de tal manera que se producen las proteínas *CYP450s* en cantidades altas (Daborn *et al.*, 2002)

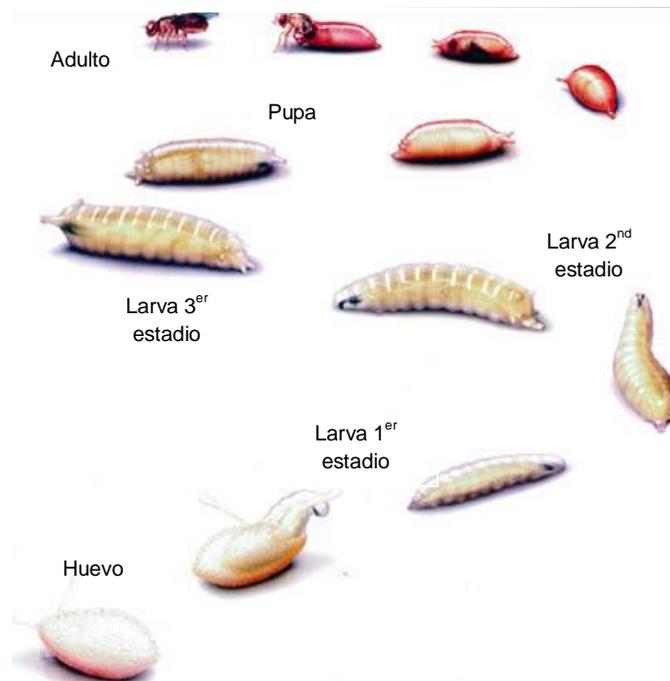
Este ensayo es capaz de detectar simultáneamente mutaciones génicas y cromosómicas en las células somáticas, representadas por eventos aneuploidogénicos, clastogénicos y/o recombinación, los cuales son producidos por una gran variedad de alteraciones, incluidas mutaciones puntuales, deleciones, recombinación somática, pérdida de un cromosoma y no disyunción, en individuos transheterocigóticos y heterocigotos (Graf *et al.*, 1984). Si durante el desarrollo ocurren este tipo de alteraciones, pueden originarse clones mutantes que en los adultos se expresarán como manchas; el tipo y tamaño de mancha es indicativo del evento genético que le dio origen: la presencia de manchas pequeñas (de una a dos células) o manchas grandes (más de dos células) puede ser indicativo de mutaciones puntuales, deleciones, pérdida cromosómica y no disyunción, mientras que, las manchas gemelas (presencia de clones *mwh* y *flr³* adyacentes) son indicativas de que ocurrió la recombinación somática. El diagnóstico para conocer el tipo de alteración presente y la cantidad de cambios, se basa en la comparación del tipo y la frecuencia de las manchas presentes, respectivamente (Graf *et al.*, 1984).

En esta prueba se utilizan dos cruzas, la estándar (CE), con niveles regulados de *CYP450s* y la craza de bioactivación elevada (CBE), con niveles altos de estas enzimas. En *Drosophila melanogaster* el sistema SMART (*Somatic Mutation and Recombination Test*) permite establecer los efectos mutacionales y recombinogénicos inducidos por diversos compuestos (Guzmán y Graf, 1995), en este caso por el metil metanosulfonato (MMS) en co-tratamiento con el Resveratrol.

Drosophila melanogaster

La mosca de la fruta, *Drosophila melanogaster*, ofrece importantes ventajas como sistema de prueba eucariótico *in vivo*. Este organismo ha sido muy utilizado en estudios de toxicología sobre varios compuestos y mezclas (Pandey y Nichols, 2011). *Drosophila melanogaster*, también conocida como la mosca de la fruta o del vinagre, es un insecto díptero holometábolo, este modelo es utilizado extensamente en experimentos de genética, ya que posee un número de cromosomas reducido (4 pares) los cuales se encuentran totalmente secuenciados (FlyBase, 2012), y un ciclo de vida corto (10-12 días a 25°C) (Figura 15). Aproximadamente el 61% de los genes de enfermedades humanas tienen homología a los de *Drosophila* y el 25.5% de sus proteínas son similares, en 80% de su secuencia, a las de los mamíferos (Celniker y Rubin, 2003). Las características principales del ciclo de vida de *Drosophila melanogaster* son un periodo de embriogénesis muy rápido (24 h después de la fertilización) seguido de un crecimiento larval que consta de tres estadios antes de presentar una metamorfosis donde emerge el imago, que posteriormente extenderá sus alas y se volverá sexualmente activo, siendo esta su etapa adulta (James *et al.*, 2005).

Uno de los procesos principales que se producen durante el desarrollo de la larva es el crecimiento de los discos imaginales que provienen de invaginaciones de la epidermis embrionaria que se desarrollan en un estadio evolutivo intermedio. Después de que las larvas presentan metamorfosis los discos imaginales se diferencian y se transforman en las estructuras adultas como apéndices, ojos, antenas, alas aparato bucal y genitales (James *et al.*, 2005).



**Figura 15. Ciclo de vida de *Drosophila melanogaster*.
(Tomada de *Drosophila Genetics and Epigenetics*, 2012)**

Eventos de pérdida de heterocigosis

El fundamento de la prueba SMART en ala está basado en “la pérdida de heterocigosis de genes marcadores mediante un tratamiento con compuestos genotóxicos que afecta directamente a las células de los discos imaginales de las larvas, los cuales conducen a la formación de un clon de células mutadas que después de la eclosión del imago se expresan como manchas en los ojos o en las alas” ocasionada por la actividad genotóxica de compuestos que inducen eventos genéticos como: mutación puntual, deleción, recombinaciones somáticas y no disyunción (Figura 16) (Graf *et al.*, 1984).

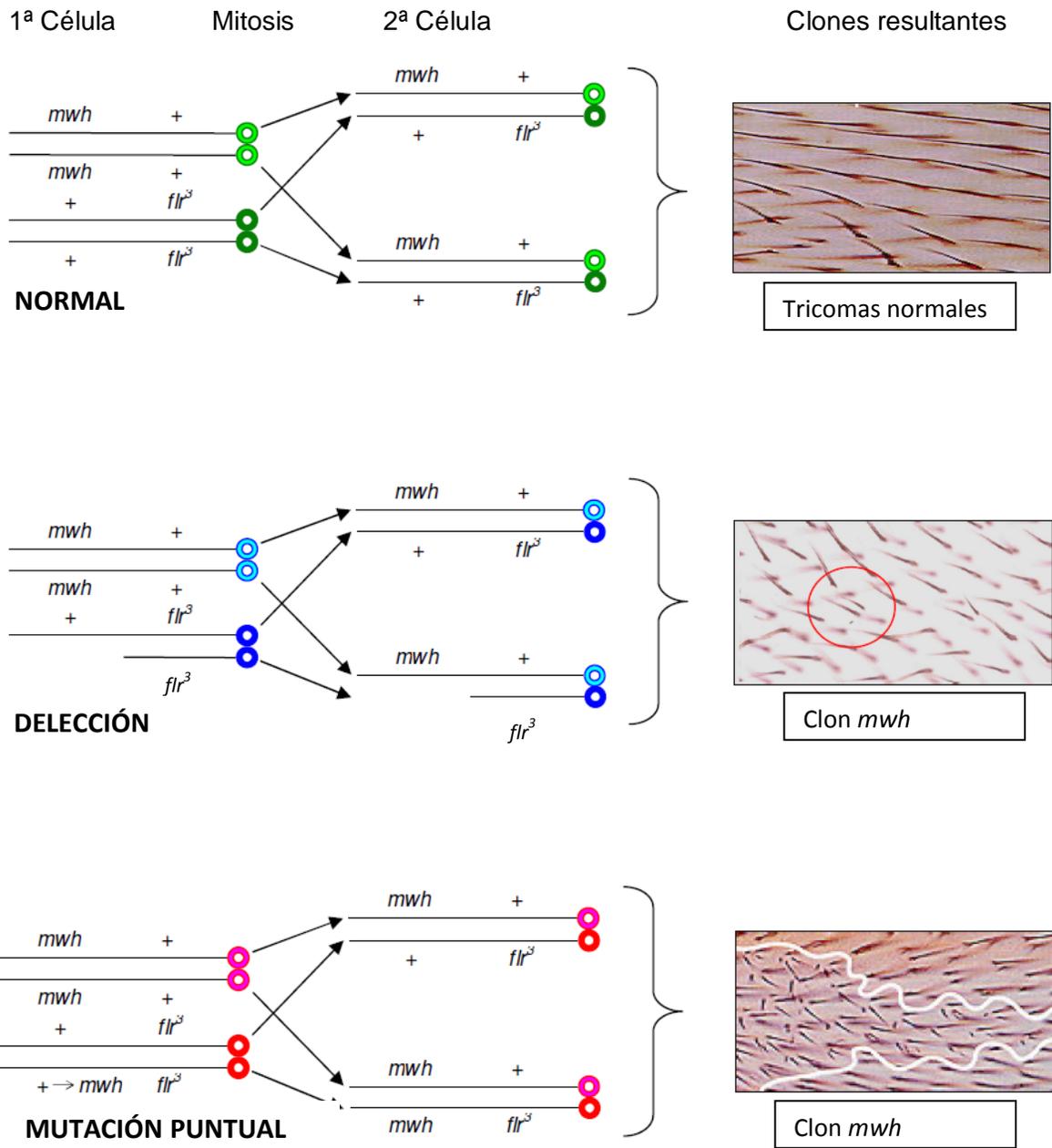


Figura 16. Eventos genéticos que conllevan a la pérdida de heterocigosis de los genes marcadores *flr³* y *mwh* y su consiguiente expresión fenotípica.

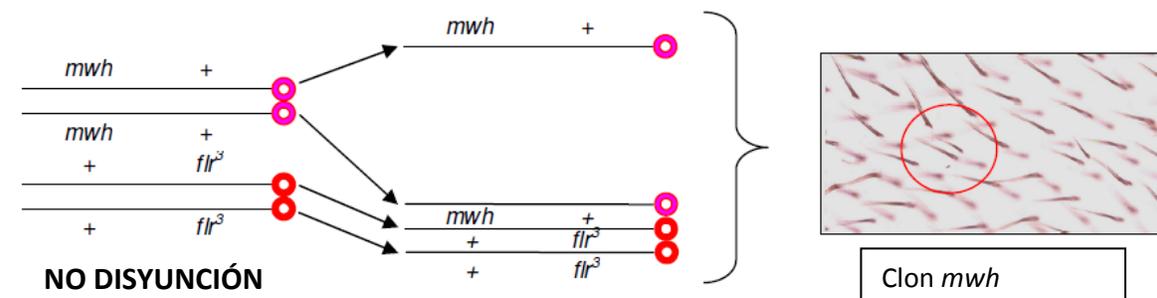
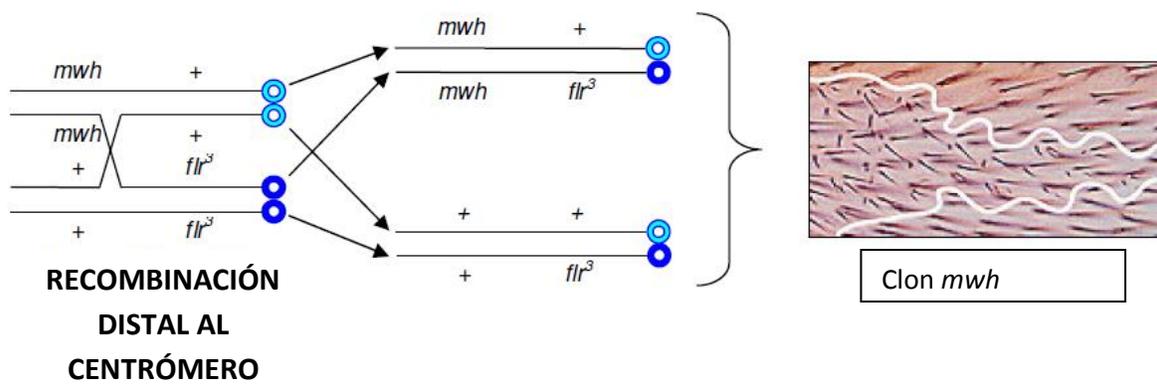
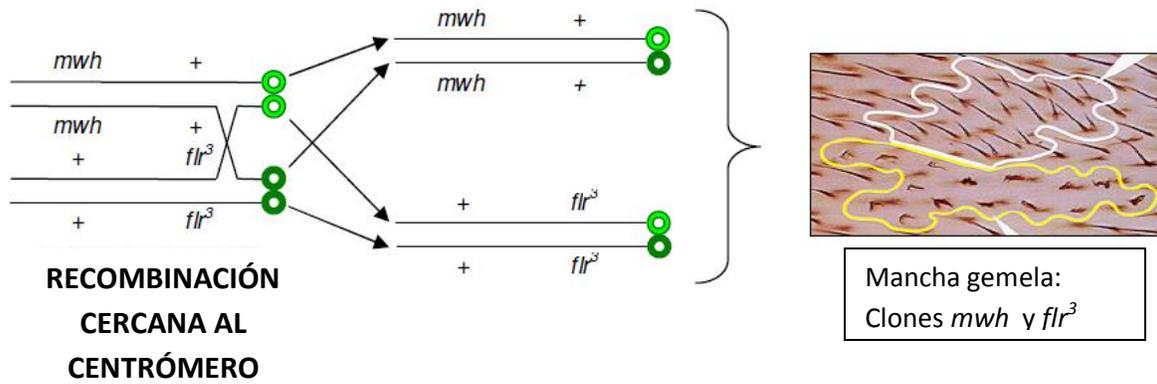


Figura 16 (Continuación). Eventos genéticos que conllevan a la pérdida de heterocigosis de los genes marcadores *flr³* y *mwh* y su consiguiente expresión fenotípica.