



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA**

**EVALUACIÓN DEL EFECTO GENOTÓXICO DEL
RESVERATROL EN LA PRUEBA DE MUTACIÓN Y
RECOMBINACIÓN SOMÁTICAS EN ALA DE *Drosophila*
melanogaster CRUZA ESTÁNDAR (CE)**

**T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE**

LICENCIADO EN BIOLOGÍA

P R E S E N T A :

SANDRA PAOLA GÓMEZ LÓPEZ

DIRECTORA DE TESIS:

M. EN C. IRMA ELENA DUEÑAS GARCÍA

LOS REYES IZTACALA, ESTADO DE MÉXICO, 2013.





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México, especialmente la Facultad de Estudios Superiores Iztacala

Mi segunda casa.

A la M. en C. Irma Elena Dueñas García

Mi asesora de tesis, a la cual le guardo mucho cariño y respeto, gracias por brindarme su apoyo y paciencia, pero sobre todo por sus consejos y enseñanzas.

A la M. en C. Ma. Eugenia Heres y al Biol. Luis Felipe Santos

Por su participación como evaluadores y por sus consejos para la realización de esta tesis.

Al Dr. Saúl Flores Maya y la Dr. Ana María García Bores

Por su amable participación como sinodales de esta tesis.

Al M. en C. Ángel Durán

Por su participación y orientación en la parte estadística de esta tesis.

A todos los miembros del laboratorio de Genética Toxicológica

Los profesores Irma, Luis, Maru, Laura, mis compañeros Miguel Ángel, Cindy, Lucero, Lalo, Andy, Jacky y Sofi, gracias por su compañía, hicieron de este lugar una muy grata estancia.

DEDICATORIAS

A mis padres Sofía y Rafael, por darme la vida, la oportunidad de ser lo que soy, por sus sacrificios y enseñanzas, los amo.

A mis hermanas Fer y Rosita, porque no me dejaron sola en los momentos malos, por toda la diversión que hemos tenido y sobre todo sus palabras, consejos y apoyo total, las amo con todo mi ser.

A mis sobrinos Saúl y Vania, porque los amo con cada parte de mí, amo poder compartir con cada uno mi vida y espero ser cada vez mejor para ustedes mis piojitos.

A mis amigos Jime (borre), Erica (stary), Jorge (lentes), Miguel (yaha) y Salma, gracias por ser como mis hermanos, por estar conmigo en los peores momentos y por compartir todo el tiempo que duró este viaje, porque vivimos cosas que jamás olvidaré, los quiero mucho morros.

A Germán, gracias por ser mi compañero en este tiempo, por apoyarme, ayudarme y estar siempre presente, te amo, gracias también a Grecia, Gloria Valencia y Germán Ramos †, porque me sentí acogida por ustedes y fueron parte importante de mi vida en este tiempo.

A Mauricio y Ariel porque el transporte a la escuela jamás hubiera sido lo mismo, por permitirme conocerlos y ser mis amigos, a Agustín por estar siempre pendiente, a Rosario, Moisés, Erick, David, Omar, Ernesto y todas esas personas especiales que he conocido en el viaje.

**...las vendas cayeron de mis ojos, las dudas se
desvanecieron y una sensación de tranquila certidumbre
ocupó su lugar.**

Lothar Meyer (1839-1895)

TABLA DE CONTENIDO

ABREVIATURAS.....	5
FIGURAS.....	6
TABLAS.....	7
GRÁFICAS.....	8
RESUMEN	9
INTRODUCCIÓN	10
<i>trans-resveratrol</i>	13
DIMETILNITROSAMINA	16
DAÑO Y REPARACIÓN DEL DNA	18
ANTECEDENTES	21
JUSTIFICACIÓN.....	27
HIPÓTESIS.....	27
OBJETIVO.....	27
MATERIALES Y MÉTODOS.....	28
METODOLOGÍA	29
Propagación de las líneas (flare y multiple wing hair).....	29
CE, colecta de huevos y recuperación de larvas.....	29
Tratamientos	30
Montaje y lectura de alas	30
Análisis estadísticos	32
RESULTADOS	34
DISCUSIÓN.....	41
CONCLUSIONES	45
REFERENCIAS.....	46
ANEXO I	54
<i>Drosophila melanogaster</i>	54
El ciclo de vida de <i>Drosophila melanogaster</i>	54
Discos Imaginales	56
ANEXO II	57
SMART (somatic mutation and recombination test)	57
DISTRIBUCIÓN DEL TAMAÑO DE CLONES MUTANTES	61
ANEXO III	62
PRUEBA U.....	62
GLOSARIO.....	64

ABREVIATURAS

CE: Cruza Estándar.

RES: *trans*-Resveratrol, Resveratrol; 3,4',5-trihidroxiestilbeno.

EtOH: Etanol.

EG: Efecto genotóxico.

DMN: Dimetilnitrosamina, N-N Dimetilamina, Nitrosodimetilamina.

AC: Aberraciones cromosómicas, CA (*Chromosomic Aberrations*).

MNs: Micronúcleos.

ICH: Intercambio de cromátidas hermanas, SCE (*Sister Chromatid Exchanged*).

SMART: Prueba de mutación y recombinación somáticas, "*Somatic Mutation and Recombination Test*".

FIGURAS

Figura 1. Metabolismo xenobiótico.

Figura 2. Estructura química del *trans*-resveratrol (*trans*-3,4',5'-trihidroxiestilbeno).

Figura 3. Moléculas blanco del *trans*-resveratrol.

Figura 4. Estructura química de la DMN.

Figura 5. Eventos genéticos que llevan a la pérdida de heterocigosis y la formación de manchas en la prueba SMART.

Figura 6. Hembra y macho de *D. melanogaster* con el marcador Bd^S y frascos lecheros para su propagación.

Figura 7. Frascos ámbar.

Figura 8. Hembra y macho fenotipo silvestre.

Figura 9. Preparación permanente de alas.

Figura 10. Tipos de manchas.

Figura 11. Mecanismos de inducción de apoptosis de RES en células MCF-7.

Figura 12. *D. melanogaster* macho y hembra respectivamente.

Figura 13. Ciclo de vida de *D. melanogaster*.

Figura 14. Discos imaginales y estructuras adultas de *D. melanogaster*.

TABLAS

Tabla 1. Contenido de RES en diferentes fuentes alimenticias.

Tabla 2. Efectos genotóxicos reportados para el RES.

Tabla 3. Efectos del RES sobre el ciclo celular y la apoptosis.

Tabla 4. Tratamientos y concentraciones de RES, EtOH, agua y DMN.

Tabla 5. Resumen de datos obtenidos al analizar las alas con fenotipo silvestre de *D. melanogaster* CE de SMART para ala.

GRÁFICAS

Gráfica 1. Frecuencias de manchas pequeñas, grandes y totales obtenidas con las cinco concentraciones de RES.

Gráfica 2. Frecuencia de tipos de manchas de los tratamientos RES.

Gráfica 3. Tamaño de los clones *mwh* por individuo CE.

Gráfica 4. Frecuencia de tipo de manchas por individuo de los tratamientos RES comparados con testigos negativo y positivo.

Gráfica 5. Frecuencia de tipo de manchas de los testigos (EtOH 1%, Agua y DMN).

RESUMEN

El resveratrol (3,4',5-trihidroxiestilbeno), se encuentra en las partes leñosas del pino y la vid, en frutos secos como nueces, cacahuates, así como en la piel de las uvas y en el vino tinto. Se asume que este polifenol, es un potente antioxidante y quimioprotector, aunque también se ha demostrado en diferentes bioensayos *in vitro* su efecto genotóxico, citotóxico y apoptótico. El efecto del *trans*-resveratrol se evaluó *in vivo* utilizando SMART en ala de *Drosophila melanogaster* Cruza Estándar. Machos *mwh/mwh* fueron cruzados con hembras vírgenes *flr³/TM3, Bd^S* para obtener la Cruza Estándar (CE). Larvas de 72 ± 4 h fueron alimentadas crónicamente con *trans*-resveratrol (RES) (2.5, 5, 10, 20 y 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$) disuelto en Etanol 1% (testigo disolvente); agua miliQ como testigo negativo y dimetilnitrosamina (0,076 mM) como testigo positivo. Las alas con fenotipo silvestre de 480 individuos en total fueron revisadas y los resultados se analizaron con el programa estadístico SMART PC-versión 2.1. El RES presentó efectos genotóxicos (EG) sin relación concentración-respuesta, siendo la concentración de RES (2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) la que mostró mayor EG, en RES (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) la frecuencia de manchas grandes disminuyó hasta cero; en RES (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) se observó EG con manchas grandes, RES (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) presentó EG con manchas pequeñas y RES (40 $\mu\text{g}/\text{mL}$) no presentó diferencias significativas con respecto al testigo negativo. La ausencia de una concentración-respuesta apoya la hipótesis de que este compuesto actúa dependiendo de su concentración, la vía celular que tome o molécula blanco a la cual se dirija y los amplios mecanismos de acción en la célula.

Palabras clave: cruza estándar, genotoxicidad, *trans*-resveratrol.

INTRODUCCIÓN

La toxicología genética es la disciplina científica que identifica y analiza la acción de un grupo de agentes tóxicos que son capaces de interactuar con el material genético de los organismos (compuestos genotóxicos). Su objetivo primordial es detectar y entender las propiedades de los agentes físicos y químicos que producen efectos hereditarios desde deletéreos hasta letales. Por lo tanto, es una ciencia que pretende establecer la correlación que existe entre la exposición a agentes xenobióticos y la inducción de alteraciones genéticas, tanto en las células germinales como en las células somáticas de los organismos, y definir a partir de ello los efectos que las toxinas producen sobre la integridad genética de los seres vivos (Rodríguez, 1995).

Los xenobióticos se definen como sustancias extrañas, es decir, ajenas al organismo, capaces de modificar el material hereditario de las células vivas (Misra y Waalkes, 1998). Entre los xenobióticos figuran los fármacos, las sustancias químicas industriales, innumerables compuestos presentes en la naturaleza, los contaminantes del medio ambiente y la dieta humana que puede incluir xenobióticos que son mutágenos, carcinógenos y promotores tumorales. Los efectos de estos compuestos en la salud tienen que ser considerados en medida de la capacidad del cuerpo para desintoxicar estos productos químicos (Yang *et al.*, 1992).

La probabilidad de que una determinada sustancia cause un daño genético depende de diversas variables, como el nivel de exposición del organismo a la sustancia, la distribución, la retención de ésta en el cuerpo, la eficiencia de los sistemas de activación metabólica y/o detoxificación, y la reactividad de la sustancia o de sus metabolitos con macromoléculas presentes en las células. Posteriormente, la posibilidad de que el daño genético produzca una enfermedad depende en última instancia de la naturaleza del daño, la capacidad que posee la célula de reparar o amplificar el daño genético, la oportunidad de expresar cualquier alteración que se haya inducido y la capacidad del cuerpo de reconocer y suprimir la multiplicación de células aberrantes (Misra y Waalkes, 1998).

La inducción de daño genético por exposición a agentes genotóxicos es un proceso que se realiza en varios pasos: la interacción química, la reparación o no del daño al DNA y los efectos biológicos. Durante el proceso, el agente xenobiótico ingresa al organismo, se absorbe, se distribuye y atraviesa las membranas. Una vez dentro de la célula, el agente puede ser reactivo por sí mismo (de acción directa), o bien puede ser activado por las enzimas metabólicas, en cuyo caso es de acción indirecta y se denomina promutágeno. Se da entonces la interacción con el DNA, que puede ser reparada eficiente o ineficientemente, de manera tal que el daño genético inicial se fije o no (Rodríguez, 1995).

Uno de los determinantes más importantes de la persistencia de xenobióticos en el cuerpo, y de su toxicidad posterior en el organismo, es el grado en que pueden ser metabolizados y excretados. Varias familias de enzimas están involucradas en el metabolismo de xenobióticos, algunas de las más importantes incluyen monooxigenasas de los citocromos P450 (Cyps), flavin monooxigenasas (FMO), alcohol y aldehído deshidrogenasas, amino oxidasas, ciclooxigenasas, reductasas, hidrolasas, glucuronidasas, sulfotransferasas, metiltransferasas, transferasas de glutatión y acetil transferasas (Rose y Hodgson, 2004).

El proceso de biotransformación es la conversión de los agentes xenobióticos liposolubles en metabolitos hidrosolubles capaces de ser excretados por las vías de eliminación. Este proceso se ha dividido a su vez en dos grandes grupos de actividad enzimática: reacciones de Fase I y Fase II (Figura 1). En la Fase I los xenobióticos son convertidos en productos más hidrosolubles mediante reacciones de óxido-reducción, pero también pueden ser activados (promutágenos o agentes genotóxicos indirectos) formándose compuestos más reactivos que los originales, los cuales podrían causar daños al DNA. En la Fase II, los metabolitos producidos en la Fase I son conjugados a otros compuestos dando por resultado un aumento grande de la hidrofiliidad del xenobiótico, lo que facilita su eliminación (Klaassen *et al.*, 1986; Casarett y Doull, 2001).

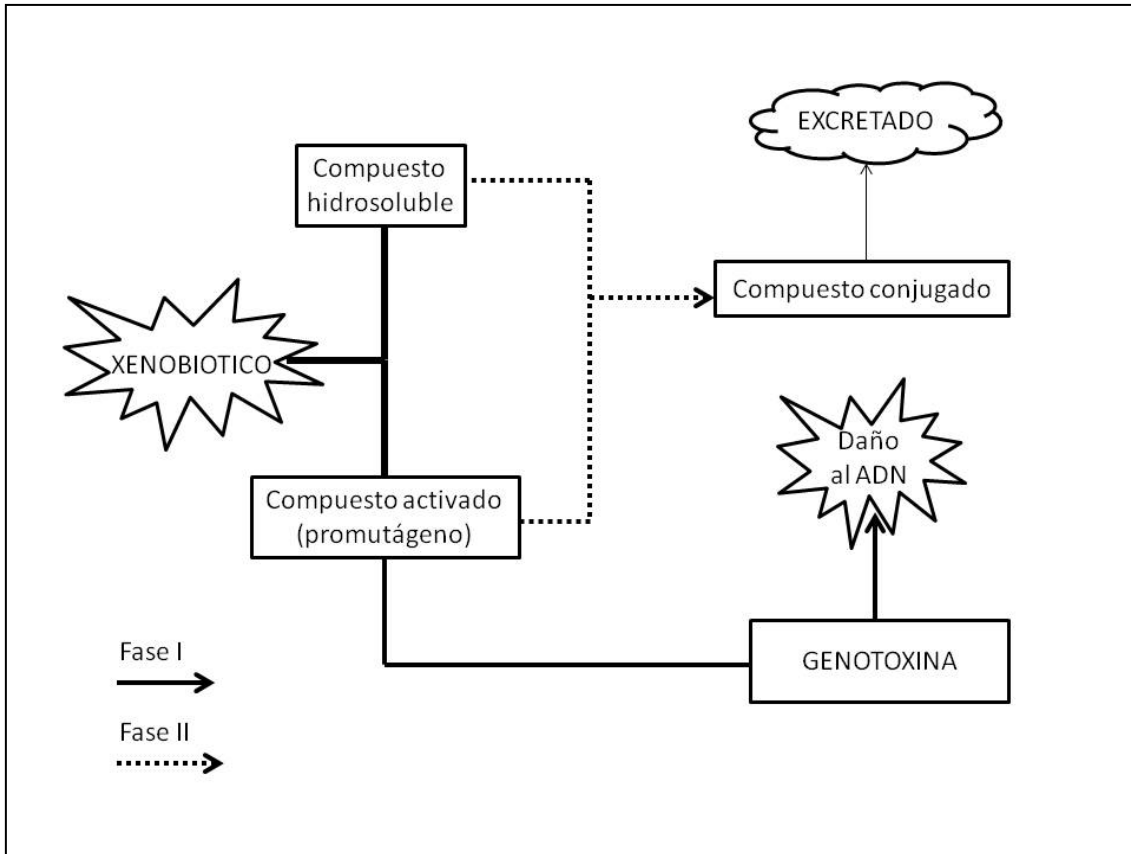


Fig. 1. Metabolismo xenobiótico (Modificado de Santos, 2006)

trans-resveratrol

El resveratrol (3,4',5-trihidroxiestilbeno) es un potente antioxidante, pertenece al grupo de los fitoquímicos polifenoles. Se encuentra en la naturaleza en las partes leñosas del pino, la vid, los frutos secos como nueces y cacahuates, en las moras, así como en otros frutos silvestres, la piel de las uvas y en el vino, especialmente el vino tinto. La cantidad de RES en las diferentes fuentes es variable (tabla 1) y depende de varios factores, por ejemplo, en la piel de la uva depende del tipo de cultivo y origen geográfico. Además se encuentra en la naturaleza en forma de isómero *cis* y *trans*, cuyo isómero *trans* (Figura 2) es la forma activa (Millán *et al.*, 2008).

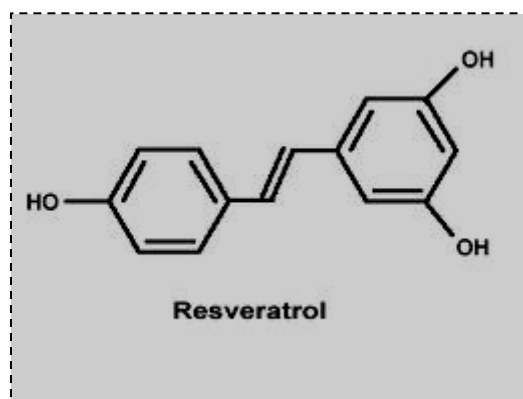


Fig. 2. Estructura química del *trans*-resveratrol (*trans*-3, 4',5-trihidroxiestilbeno) (Millán *et al.*, 2008).

Algunas plantas sintetizan *trans*-resveratrol (RES) por las siguientes causas: al ser infectadas por microorganismos, al ser expuestas a la radiación ultravioleta y también cuando se lesionan o se ven sometidas a estrés. Es por eso que esta molécula es conocida como una fitoalexina (moléculas implicadas en una reacción de defensa de la planta) (Masten, 2002).

El RES fue aislado por primera vez en 1940 de las raíces de eléboro blanco (*Veratrum grandiflorum* O. Loes) y más tarde, en 1963, de las raíces de la enredadera japónica (*Polygonum cuspidatum*) una planta utilizada en la medicina tradicional china y japonesa. Inicialmente caracterizado por ser fitoalexina, el RES atrajo poco interés hasta que en 1992 se postuló para explicar algunos de los efectos cardioprotectores del vino tinto. Desde entonces, decenas de informes han demostrado que el RES puede prevenir o retrasar la progresión de una amplia variedad de enfermedades, incluyendo el cáncer, las enfermedades cardiovasculares y las lesiones isquémicas (Baur y Sinclair, 2006), así como mejorar la resistencia al estrés y enfermedades en roedores (Millán *et al.*, 2008) y extender la vida de varios organismos desde levaduras hasta vertebrados (Lekli *et al.*, 2008; Bass *et al.*, 2007).

Tabla 1. Contenido de RES en diferentes fuentes alimenticias (Adaptado de Planas *et al.*, 2011).

FUENTE	CONCENTRACIÓN DE TRANS-RESVERATROL
Vino rojo	0.1 – 14.3 mg/L
Vino blanco	0.1 – 2.1 mg/L
Uva	50 – 100 µg/g
Cacahuete	0.02 – 1.92 µg/g
Pistache	0.09 – 1.67 µg/g
Mora	~ 32 ng/g
Arándano	~ 16 ng/g

El RES exhibe diferentes mecanismos de acción y tiene como blancos un gran número de moléculas intracelulares (Figura 3) (Shakibaei *et al.*, 2009). El RES posee una fuerte bioactividad y ejerce acción protectora, sin embargo también se ha demostrado su acción citotóxica lo cual arroja una paradoja acerca de los mecanismos que evidencian los efectos benéficos. Por lo tanto se puede pensar que aparentemente estos efectos se muestran en reacción a un daño severo provocado por parte del RES (Berardi *et al.*, 2009).

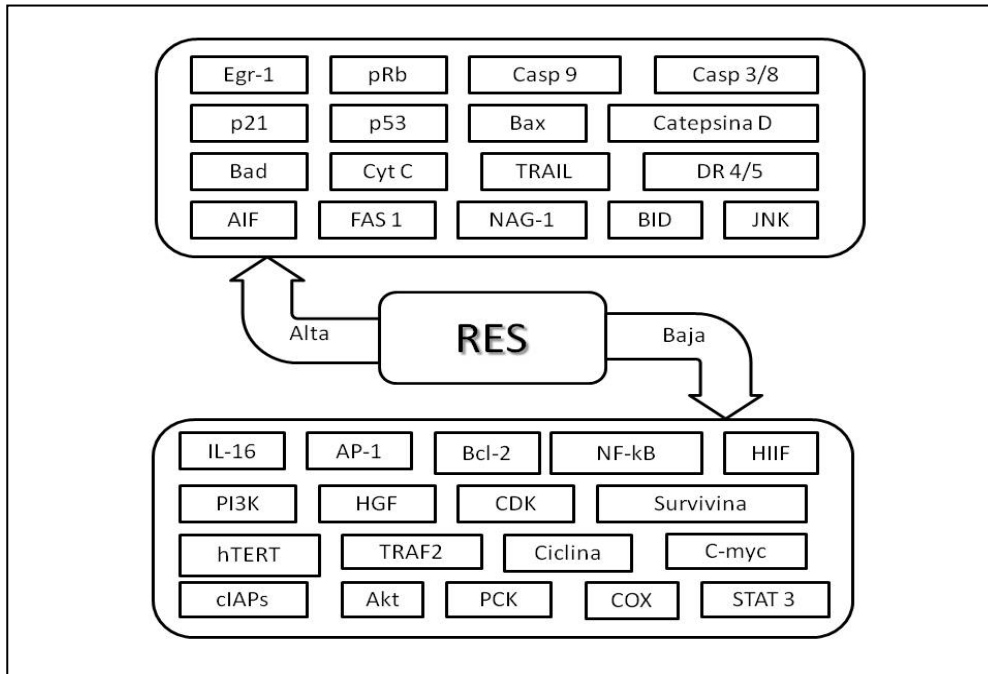


Fig. 3. Moléculas blanco del *trans*-resveratrol. En conjunto estas moléculas están implicadas en mecanismos antiproliferativos, citotóxicos, citostáticos, apoptóticos, antiinflamatorios, etcétera (Modificado de Shakibaei *et al.*, 2009).

DIMETILNITROSAMINA

Los nitratos y nitritos son compuestos iónicos que se encuentran en la naturaleza, formando parte del ciclo del nitrógeno. El nitrato (-NO₃) es la forma estable de las estructuras oxidadas del nitrógeno, y a pesar de su baja reactividad química puede ser reducido por acción microbiológica. El nitrito (-NO₂), es oxidado con facilidad por procesos químicos o biológicos a nitrato, o bien reducido, originando diversos compuestos y pueden causar la formación endógena de N-nitrosocompuestos, de efectos cancerígenos (como las nitrosaminas). Los N-nitrosocompuestos son agentes teratógenos, mutágenos y probables carcinógenos, altamente peligrosos para la salud humana. Se originan como consecuencia de la reacción de las aminas secundarias (aromáticas y alifáticas) con el ácido nitroso HNO₂ (Antón y Lizaso, 2010).

El representante más sencillo de las nitrosaminas es la dimetilnitrosamina (DMN) que es un líquido amarillo que no tiene ningún olor distintivo. La DMN (Figura 4) es usada como solvente en la industria del plástico y la fibra, como aditivo para lubricantes, en la preparación de solventes y como nematicida (Murillo-Romero, 1997).

La DMN no persiste en el medio ambiente pero si es liberada en la atmósfera, se descompone por la luz solar en cuestión de minutos; cuando se libera en la superficie del suelo, se puede evaporar, degradarse por la exposición a la luz del sol, o degradarse durante meses en el suelo profundo; si es liberada en el agua, puede degradarse de igual manera por exposición a la luz solar (ATSDR, 1989; Windholz *et al.*, 1995).

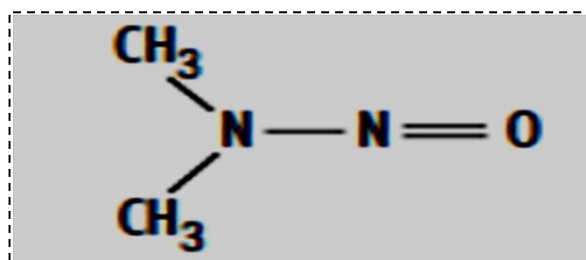


Fig. 4. Estructura química de la DMN (Windholz *et al.*, 1995).

La DMN es capaz de inducir mutaciones génicas y cromosómicas, incrementar la frecuencia de intercambios entre cromátidas hermanas, es positiva en la prueba SMART (Castañeda, 2011), e induce un incremento de micronúcleos en reticulocitos de médula ósea de mamíferos y en línea celular hepática HepG2 (Wolf et al., 2003; Liviac, 2010).

DAÑO Y REPARACIÓN DEL DNA

El ciclo celular es un fenómeno muy complejo donde el material celular es dividido equitativamente entre las células hijas. Antes de la división celular por mitosis ha habido duplicación y división de todos los componentes fundamentales, particularmente de los involucrados en la transmisión hereditaria. En este aspecto la división celular puede ser considerada como la separación final de todas las unidades macromoleculares requeridas en la generación de una nueva célula (Robertis, 1960). Por lo tanto el ciclo celular de las células eucariotas involucra una secuencia ordenada de eventos que resultan en una transmisión exitosa de material genético a las células hijas (Siede *et al.*, 1993).

En este proceso el material genético de la célula puede ser dañado teniendo como consecuencia alteraciones en el DNA como: formación de **a) sitios apurínicos/apirimídicos**: se presenta cuando el enlace glucosídico entre la base nitrogenada y la desoxirribosa se rompe, lo cual conlleva a la eliminación de una purina o pirimidina del DNA, **b) desemparejamientos en los pares de bases**: son pares de bases que no forman las parejas Watson-Crick complementarias del DNA: A-T y G-C en la doble cadena y se originan por fallas durante la replicación, la recombinación, o por desaminación espontánea de las bases, **c) rompimientos sencillos y dobles**: son cortes en una de las cadenas en el esqueleto azúcar-fosfato “sencillo” (SSB) o en la doble hélice “doble” (DSB), originados por especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés), radiaciones ionizantes o agentes químicos, **d) bases alteradas**: bases que se dañan por exposición a ROS, luz ultravioleta, radiaciones electromagnéticas, como los rayos X y gammas, o agentes químicos, **e) enlaces cruzados**: consisten en la unión entre bases, azúcares o fosfatos, a través de compuestos que forman enlaces covalentes entre ellos, o los enlaces “puente” entre los O y N en una banda o en bandas opuestas del DNA formando aductos que impiden la replicación o la transcripción. Cuando estas alteraciones no son reparadas se producen mutaciones

puntuales, aberraciones cromosómicas, intercambio de cromátidas hermanas (ICH) y recombinación somática (Jenkins *et al.*, 2005; Friedberg *et al.*, 2006).

Dado el enorme espectro de daño al genoma por exposición a agentes ambientales, genotóxicos, las células están envueltas en múltiples mecanismos de reconocimiento y reparación del DNA en diferentes fases del ciclo celular. De acuerdo con su principal tipo de acción durante el ciclo celular mitótico, se clasifican en: pre-replicativos, dependientes de la fase S y post-replicativos.

Los mecanismos de reparación pre-replicativos son: **a) reversión simple:** los rompimientos simples son corregidos por una ligasa que une los extremos, siempre y cuando el daño consista únicamente en la pérdida de la unión fosfodiéster, **b) reversión por alquiltransferasas:** ésta es responsable de la respuesta de adaptación a la exposición sucesiva a alquilantes. Consiste en la eliminación de los grupos alquilo, en los oxígenos exocíclicos de la guanina (O6-G), de la timina (O4-T) y fosfatos, **c) fotoreparación:** diferentes transferencias de electrones eliminando dímeros de pirimidina, **d) escisión de bases:** (BER) implica la escisión de una o hasta 7 bases por acción de glicosilasas que rompen el enlace glicosídico entre el C1 de la desoxirribosa y el N1 de las pirimidinas o el N9 de las purinas; provocando la formación de sitios AP que activan a AP-endonucleasas; éstas rompen el enlace fosfodiéster en los sitios 5' ó 3' cercanos al daño, las exonucleasas eliminan los residuos del esqueleto sin bases, la DNA polimerasa sintetiza el segmento faltante (5'-3') y una ligasa une los extremos libres, **e) escisión de nucleótidos:** (NER) inicia con el corte por endonucleasas de la cadena a ambos lados de los nucleótidos dañados, la eliminación de los residuos abásicos por exonucleasas, la síntesis de nuevos nucleótidos por la DNA polimerasa y la unión de los extremos por ligasas (Friedberg *et al.*, 2006).

Los post-replicativos son: **a) reparación de rompimientos dobles por recombinación entre homólogos:** (HRR) repara los rompimientos dobles (DSBs) ocasionados principalmente por la acción de agentes físicos y ROS. La presencia de DSBs detiene la transcripción y el ciclo celular. En esta reparación la cadena que no está rota sirve de molde o templete para que se polimerice el segmento faltante y por último enzimas ligasas unen los extremos libres y las cadenas reparadas se separan, o **b) entre no**

homólogos: (NHEJ) en esta reparación intervienen diversas proteínas como la DNA-PK Ser/Treo [Ku70 + Ku86 + DNA-PKcs] que se pega a los DSBs facilitando la recombinación entre cromosomas no homólogos y **c) corrección de errores o desemparejamientos:** (MMR) cuando el DNA está dañado puede ocurrir la síntesis que ignora los errores en la información y produce errores a lo largo de la nueva cadena. Este mecanismo reconoce el daño y repara los defectos de la cadena nueva (Friedberg *et al.*, 2006).

ANTECEDENTES

Existe una variedad de estudios en los cuales se evalúan los efectos genotóxicos del RES donde se menciona que posee actividad citotóxica además de inducir aberraciones cromosómicas, micronúcleos e intercambio de cromátidas hermanas (Tabla 2), así como su actividad sobre el ciclo celular y la apoptosis (Tabla 3). Estos trabajos fueron realizados en diferentes ensayos y modelos experimentales, por lo que a continuación se muestra un resumen de los resultados obtenidos de estos estudios.

Tabla 2. Efectos genotóxicos reportados para el RES.

Autor y año	Título	Ensayo	Resultados
Matsuoka <i>et al.</i> , 2001	El RES, un polifenol natural, induce intercambio de cromátidas hermanas en una línea celular pulmonar de hámster chino (CHL)	Test de citotoxicidad <i>in vitro</i>	El RES reduce el número de células en la fase G1. Disminuye la supervivencia en tratamientos a 24 y 48 h.
		Aberraciones cromosómicas (AC)	Induce AC estructurales, sobre todo rompimiento e intercambio de cromátidas hermanas. Inhibe la proliferación celular en la concentración 20 µg/mL.

		Micronúcleos (MN)	El RES presenta ligero aumento en las células con MN con 24 h de tratamiento y un aumento constante de células con MN y polinúcleos (PN) con 48 h de tratamiento de manera dosis-dependiente en concentraciones arriba de 10 µg/mL.
		Intercambio de cromátidas hermanas (ICH)	El RES induce intercambio de cromátidas hermanas de manera dosis-dependiente en concentraciones arriba de 10 µg/mL. Inhibe la proliferación celular con 20 µg/mL.
		Análisis de ciclo celular por FACScan	Disminuye el número de células en la fase G1 y causa arresto en la fase S induciendo apoptosis después de 48 h de tratamiento.
Schmitt <i>et al.</i> , 2002	Actividad hormonal y genotóxica del RES	Análisis de proliferación celular	En células MCF-7 el RES inhibe el crecimiento celular con las concentraciones (10 nM-10 µM).

		MN	En las células de linfoma de ratón L5178Y reduce proliferación celular y viabilidad celular, así como una inducción de MN. En células de hámster chino V79 a un tratamiento de 6h con 100 μ M de RES se inducen MN.
		Análisis del ciclo celular	RES provoca retraso en la fase G1 del ciclo celular con concentraciones de 10 μ M-60 μ M en células L5178Y.
Fukuhara <i>et al.</i> , 2008	Efecto de la sustitución de metilo en la propiedad antioxidante y la genotoxicidad del RES	AC	El RES induce una alta frecuencia de AC consistentes en evidentes interrupciones y rupturas de cromátidas.
Mitruț <i>et al.</i> , 2009	El estudio de genotoxicidad de RES en cultivo celular de adenocarcinoma gástrico primario.	MN	El RES produce micronúcleos dosis-dependiente (5, 10 y 20 μ g/mL) en cultivos celulares de adenocarcinoma gástrico primario, encontrándose el mayor número de MN con

Williams <i>al.</i> , 2009	<i>et</i>	Estudios de seguridad de <i>trans</i> -RES de alta pureza en animales de experimentación.	AC	la dosis más alta: 20 µg/mL En ausencia de activación metabólica (S9) causa incrementos estadísticamente significativos de AC con 10, 20 y 30 µg/mL y en activación metabólica causa incrementos estadísticamente significativos con 40 y 50 µg/mL en linfocitos humanos.
-------------------------------	-----------	---	----	--

Tabla 3. Efectos del RES sobre el ciclo celular y la apoptosis.

Autor y año	Título	Resultados
Szende, <i>et al.</i> , 2000	Efecto dependiente de la dosis del RES sobre la proliferación celular y apoptosis en cultivo de células tumorales y endoteliales.	En cultivo de células de cáncer de colon y endoteliales el RES aumenta proliferación celular con dosis bajas (0.1-10 µg/mL) y con dosis altas (10-100 µg/mL) induce apoptosis.
Sgambato, <i>et al.</i> , 2001	RES, un compuesto polifenólico natural, inhibe proliferación celular y previene daño oxidativo del DNA.	En líneas celulares Rat-1, HC11, MCF-7, T47-D, HCT116, HT-29, PC3, Du145, HeLa tratadas con RES, a concentraciones mayores de 20 µM se redujo el número de células en fase G2/M y aumentó el de células en la fase S.
Pozo-Guisado, <i>et al.</i> , 2005	El RES induce apoptosis en línea celular de cáncer de mama en humanos MCF-7, implica un mecanismo caspasa-independiente con regulación de Bcl-2 y NF-kB.	En células MCF-7 el RES provoca una pérdida significativa en el potencial de membrana de la mitocondria y un gran aumento de ROS lo que fue coincidente con los niveles bajos de Bcl-2 y NF-kB, y la inducción de apoptosis.
Berardi, <i>et al.</i> , 2009	RES exhibe actividad citotóxica en cultivos celulares y posee acción contra polyomavirus: Uso clínico potencial.	En células tumorales HL60 y línea de fibroblasto normal de ratón 3T6 causa efectos citotóxicos llevando a las células a apoptosis a las concentraciones de 20 y 40 µM.

García, <i>et al</i> , 2012.	RES causa arresto del ciclo celular, disminuye síntesis de colágeno y apoptosis en células de músculo liso intestinal de rata.	En células intestinales a concentraciones de 50 y 100 μM el RES efectúa arresto en fase S del ciclo celular, así como efectos antiproliferativos dosis dependiente en concentraciones arriba de 25 μM .
Stocco, <i>et al</i> , 2012.	Efecto dosis dependiente del RES sobre células cancerosas de vejiga.	En células ECV304 (derivadas de la línea celular de carcinoma de vejiga T24) RES causa muerte celular en (>20 μM). Además de que a altas dosis >50 μM reduce los niveles de la proteína Bcl-2 (antiapoptótica) y aumenta los de Bad (proapoptótica). A bajas dosis no induce muerte celular (0.1-20 μM)

JUSTIFICACIÓN

Recientemente se ha extendido el uso del RES en la dieta humana, como complemento alimenticio (Masten, 2002) debido a su presunto efecto protector y su amplia variedad de respuestas a diferentes enfermedades crónicas. No obstante, considerando lo reportado en la literatura científica se asume que este polifenol podría tener efecto genotóxico. El RES posee varias propiedades biológicas y se ha postulado que exhibe diferentes mecanismos de acción teniendo como blanco a numerosas moléculas intracelulares. Aunque la mayoría de los estudios indican que el RES destruye las células tumorales de forma selectiva, existen evidencias que sugieren que algunas células normales como las células endoteliales, los linfocitos y los condrocitos son vulnerables a este compuesto (Shakibaei *et al.*, 2009). Debido a la controversia generada sobre sus mecanismos de acción se ha elevado en los últimos años el interés por este compuesto, por lo que se consideró necesario evaluar el efecto genotóxico del RES en un ensayo *in vivo*.

HIPÓTESIS

Dado que el RES presenta efectos genotóxicos en diferentes ensayos, se espera encontrar un incremento significativo en las frecuencias de manchas al alimentar las larvas de *D. melanogaster* con las distintas concentraciones de RES al compararlas con la frecuencia del testigo negativo.

OBJETIVO

- Evaluar el efecto genotóxico del RES utilizando el ensayo de mutación y recombinación somáticas (SMART) en ala de *Drosophila melanogaster* cruza estándar.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se prepararon las concentraciones 2.5, 5, 10 20 y 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de *trans*-resveratrol (RES), proporcionado por la Dra. Ana María García Bores del Laboratorio de Fitoquímica de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM; como control negativo se utilizó etanol (Merck® CAS-64-17-5; 99.9 % de pureza) diluido al 1% (EtOH 1%) con el que se disolvió al RES y como testigo positivo DMN 0.074 mM (Sigma Aldrich® CAS-62-75-9; 99.9% de pureza). Tanto el EtOH como la DMN fueron diluidos en agua milliQ. Se realizaron cuatro réplicas por tratamiento (Tabla 4) en tres experimentos independientes.

Tabla 4. Tratamientos y concentraciones de RES, EtOH, agua y DMN.

Tratamientos	Concentraciones
RES	2.5 , 5, 10 20 y 40 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
EtOH (solvente del RES)	1% v/v
Agua miliQ	
Testigo positivo DMN	0.076 mM (Castañeda, 2002)

METODOLOGÍA

Prueba SMART en ala (Anexo II)

PROPAGACIÓN DE LAS LÍNEAS (flare y multiple wing hair)

Las líneas flare ($flr^3/TM3$, Bd^S) y multiple wing hair (mwh/mwh) de *D. melanogaster* fueron propagadas en frascos lecheros de 250 mL esterilizados, conteniendo 5 g de hojuelas de papa deshidratada Maggi® y 20 mL de solución conservadora, la cual contiene ácido propiónico y Tegosept (que es una mezcla de ácido propiónico y nipagin al 12% en etanol) (Figura 6), lo anterior es utilizado como medio de cultivo a una temperatura de 25°C, 60% de humedad relativa (HR) y en total oscuridad.

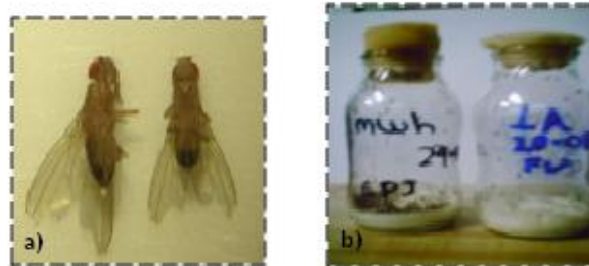


Fig. 6. a) Hembra y macho de *D. melanogaster* (respectivamente) con el marcador Bd^S ; b) Frascos lecheros donde se realiza la propagación y mantenimiento de las diferentes líneas.

CE, COLECTA DE HUEVOS Y RECUPERACIÓN DE LARVAS

Para la CE se utilizan hembras vírgenes de la línea flare y machos de la línea multiple wing hair.

Para la colecta de huevos se preparó un medio con levadura fresca la cual se activó con sacarosa y agua del grifo. La mezcla fue colocada en frascos lecheros de 250 mL tapados con tela de organza y se dejó secar durante la noche a temperatura ambiente, después se depositaron los adultos de la crusa flare X multiple wing hair durante



8 h a 25°C y 60% de HR en total oscuridad. Transcurridas las 8 h se retiraron las moscas adultas y los frascos con la colecta de huevos se colocaron en la incubadora a 25°C y 60% de HR en total oscuridad durante 72 h para posteriormente recuperar larvas de tercer estadio (72 ± 4 h de edad), concluido este tiempo los frascos con levadura activada fueron enjuagados rápidamente con agua a 25°C en una coladera con organza, hasta disolver la levadura para así tener únicamente a las larvas.

TRATAMIENTOS



Las larvas recuperadas fueron colocadas en tubos de ensayo con 0.5 g de medio de cultivo instantáneo (*Carolina Biological Supply Co. Burlington N.C. USA*) hidratado con 2 mL de cada uno de los tratamientos (Tabla 1) en. Se incubaron hasta terminar su desarrollo (42 h) a 25°C, 60% de HR y en total oscuridad.

MONTAJE Y LECTURA DE ALAS

Los imagos de cada uno de los tratamientos fueron recuperados y conservados en frascos ámbar de 5 mL con alcohol al 70% (Figura 7). Posteriormente se seleccionaron aleatoriamente un total de 60 individuos por tratamiento, cuidando que fueran el mismo número de machos y de hembras (Frei y Würigler, 1995) con alas de fenotipo

silvestre ($mwh\ flr^3+ / mwh+ flr^3$) (Figura 8). El montaje de alas se realizó en preparaciones permanentes con Entellan® (Figura 9).

Las laminillas se etiquetaron con una clave para evitar prejuicio en la revisión de los tratamientos y se analizaron en un microscopio óptico a 40X.



Fig. 7. Frascos ámbar.



Fig. 8. Hembra y macho fenotipo silvestre.

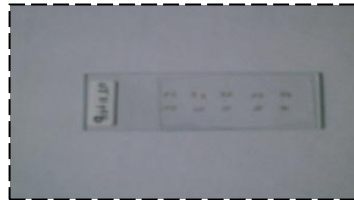


Fig. 9. Preparación permanente de alas.

Se contabilizaron las manchas de células mutantes (clones) por individuo (Figura 10) y se registraron de acuerdo con Graf *et al.* (1984)..

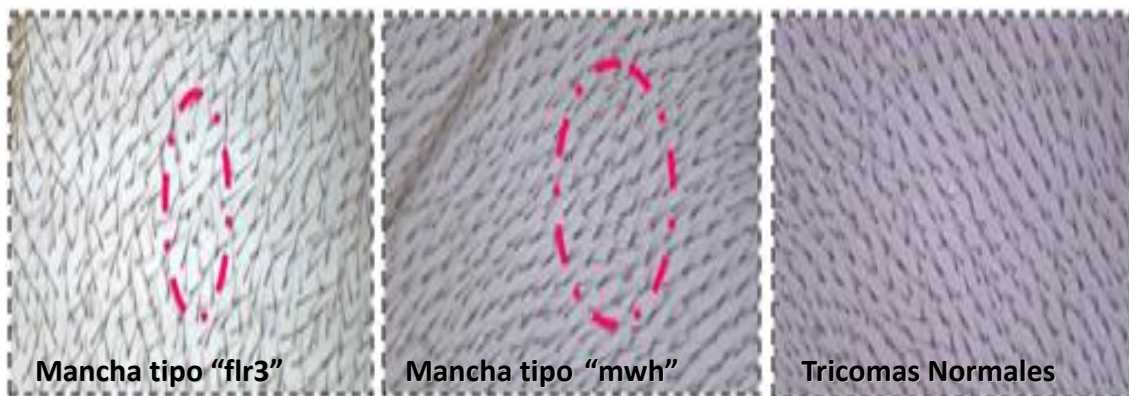


Fig. 10. Tipos de manchas. Las manchas que son contabilizadas para la prueba SMART pueden ser de dos tipos: La mancha tipo flr3 que se muestra en forma de "llama" y el mwh el cual es más de un tricoma por célula simulando un "maguey".

Los datos obtenidos se procesaron en el programa estadístico SMART PC-versión 2.1 de Frei y Würzler (1988), que se basa en la prueba estadística Ji^2 para proporciones. Este análisis permite decidir si la frecuencia de manchas inducidas en los tratamientos tiene un diagnóstico positivo, débil positivo, negativo o indeciso con base en las siguientes hipótesis:

- Hipótesis nula (H_0): Indica que la frecuencia de mutaciones inducidas y espontáneas no es significativamente mayor a la frecuencia del testigo negativo.

- Hipótesis alternativa (H_a): Señala que la frecuencia de las manchas inducidas sea “m” veces mayor que la frecuencia del testigo negativo (Graf *et al.*, 1984), donde “m” es el factor de multiplicación, utilizado para realizar este análisis estadístico, basado en los resultados que se obtendrían al usar como agente mutagénico radiación ionizante, y que indica cuántas veces debe incrementarse el número de eventos de los tratamientos con respecto al testigo para considerar una respuesta genotóxica positiva.

Las manchas pequeñas (1-2 células) son más comunes, por lo que predominan en relación con la frecuencia de manchas grandes (>3 células) y las manchas gemelas, por lo que deben analizarse estadísticamente por separado para evitar una sobreestimación de la inducción de las manchas menos comunes. De esta manera, para considerar un incremento significativo en la frecuencia de manchas pequeñas y totales (se obtiene de la suma de todas las manchas, por lo que la contribución de las manchas pequeñas es predominante) se utiliza $m=2$, mientras que para las manchas

grandes y gemelas $m=5$. Por ende son posibles las siguientes cuatro decisiones (Frei y Würgler, 1988):

1. Aceptar 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 H_0 y aceptar H_a : indeciso

De acuerdo con Frei y Würgler (1995) para obtener un diagnóstico significativo deben registrarse un mínimo de 55-60 individuos (110-120 alas por tratamiento por experimento).

Los resultados débiles positivos e indecisos fueron analizados con la prueba no paramétrica de U de Mann-Whitney STAT graphics versión 6.0 (Frei y Würgler, 1995) Anexo III.

Para analizar la distribución de los clones mwh y determinar si la división celular fue afectada, se realizó la prueba Kolmogorov-Smirnov.

RESULTADOS

Los resultados obtenidos después de revisar las alas de 480 individuos y del análisis estadístico de estos datos se muestran en la Tabla 5 y Gráficas 1 a la 5. El RES presentó efectos genotóxicos sin relación concentración-respuesta (Gráfica 1) encontrándose los siguientes resultados destacables: a) efecto genotóxico en la concentración más baja (2.5 µg/mL) con resultados positivos en manchas pequeñas y grandes, lo cual se vio reflejado en las manchas totales; b) en la concentración 5 µg/mL la frecuencia de manchas grandes disminuyó hasta cero; c) efecto genotóxico de RES 10 µg/mL para manchas grandes, aunque la frecuencia para las manchas totales se mantiene por debajo de RES 5 µg/mL; d) RES (20 µg/mL) presentó efecto genotóxico para manchas pequeñas reflejándose en manchas totales y e) RES (40 µg/mL) no presentó diferencias significativas con respecto al testigo negativo (Tabla 5 A y Gráficas 1 y 2) .

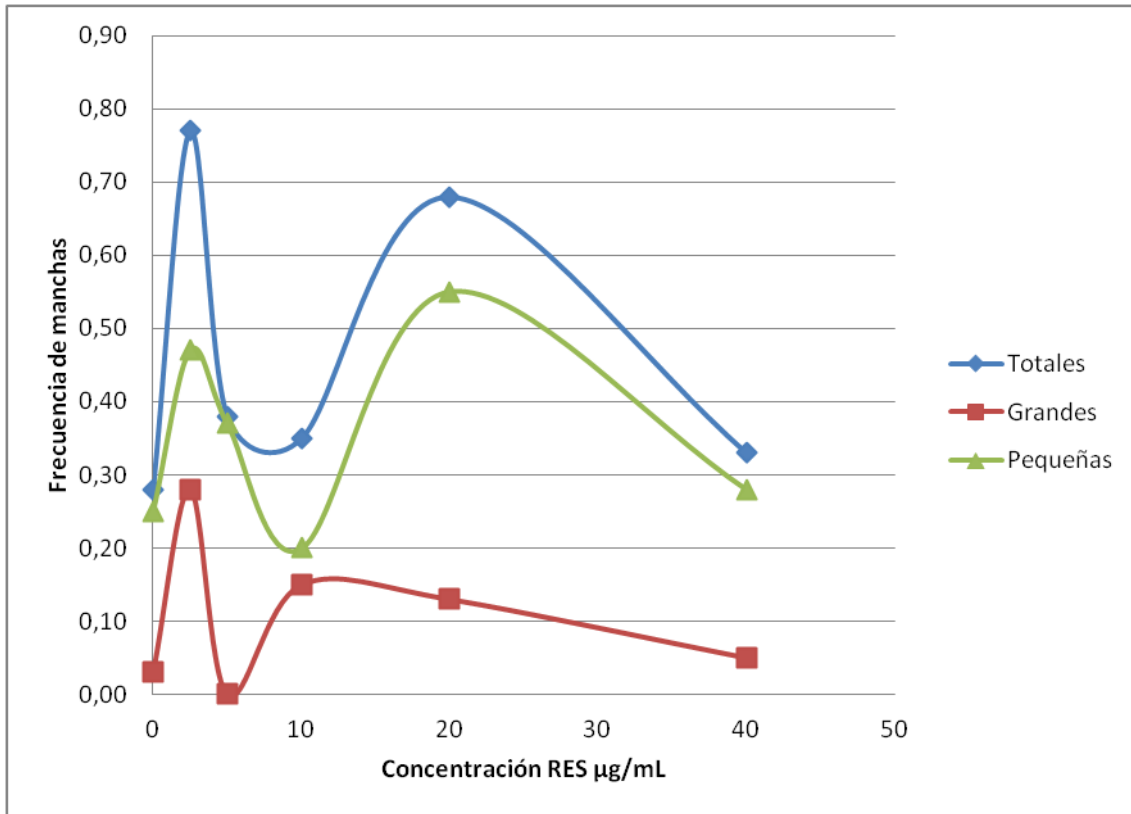
En la Gráfica 3 se indican las frecuencias del tamaño de los clones *mwh* en las cinco concentraciones de RES y se puede ver que para todas las concentraciones se encontró mayor incidencia en manchas pequeñas que en grandes lo cual podría deberse a dos eventos (Graf *et al.*, 1984): a) el efecto tardío del compuesto sobre el material genético; b) el efecto de la aneuploidía del cromosoma 3.

Como se esperaba, el testigo DMN arrojó resultados positivos en todos los tipos de manchas mostrando un claro efecto genotóxico, lo que comprueba la actividad recombinogénica y mutagénica de este compuesto (Mendoza *et al.*, 1985; Neguishi *et al.*, 1991; Castañeda, 2011; Liviac 2010) (Tabla 5 B y Gráficas 4 y 5). Además el testigo EtOH 1% no presentó diferencias en las frecuencias de manchas con respecto al testigo agua, por lo que se considera un disolvente no genotóxico (Geer *et al.*, 1988; Fuentes y Quintero, 2010) (Tabla 5 A y Gráficas 4 y 5).

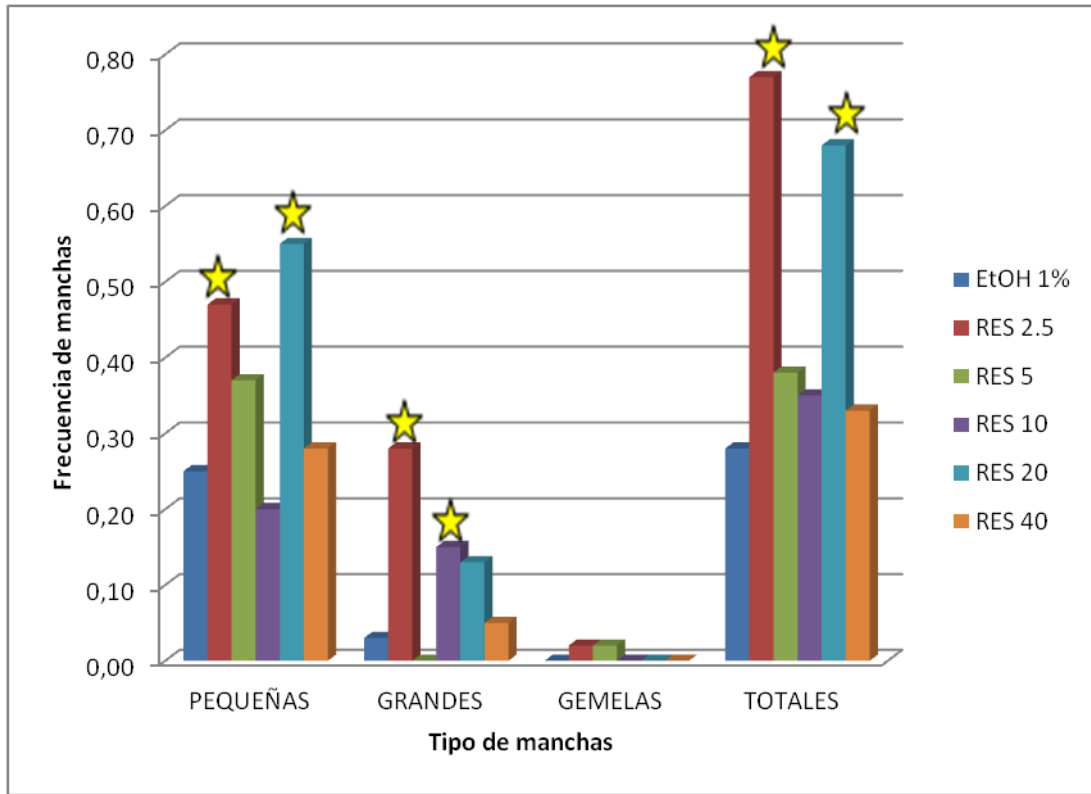
Tabla 5. Resumen de resultados obtenidos al analizar las alas con fenotipo silvestre de *D. melanogaster* CE de SMART para ala. Después de alimentar de manera crónica a larvas de 72 ± 4 hr, con EtOH 1%, Agua miliQ, RES (2.5, 5, 10, 20 y 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$), y Dimetilnitrosamina (DMN) 0.076 mM.

Manchas por individuo (número de manchas)*										
Tratamiento	Número de individuos	Manchas pequeñas (1-2 células) m=2		Manchas grandes (>2 células) m=5		Manchas gemelas m=5		Manchas m=2	totales	Clones mwh
Cruza Estándar (CE)										
A. Tratamientos										
EtOH 1%	60	0.25 (15)		0.03 (2)		0.00 (0)		0.28 (17)		17
Agua	60	0.30 (18) -		0.08 (5) -		0.00 (0) -		0.38 (23)	-	23
RES 2.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$	60	0.47 (28) +		0.28 (17) +		0.02 (1) -		0.77 (46)	+	45
RES 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$	60	0.37 (22) -		0.00 (0) -		0.02 (1) -		0.38 (23)	-	23
RES 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$	60	0.20 (12) -		0.15 (9) +		0.00 (0) -		0.35 (21)	-	21
RES 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$	60	0.55 (33) +		0.13 (8) -		0.00 (0) -		0.68 (41)	+	40
RES 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$	60	0.28 (17) -		0.05 (3) -		0.00 (0) -		0.33 (20)	-	19
B. Testigos										
Agua	60	0.30 (18)		0.08 (5)		0.00 (0)		0.38 (23)		23
DMN 0.076 mM	60	3.25 (195) +		3.45 (207) +		0.08 (5) +		6.78 (407)	+	380

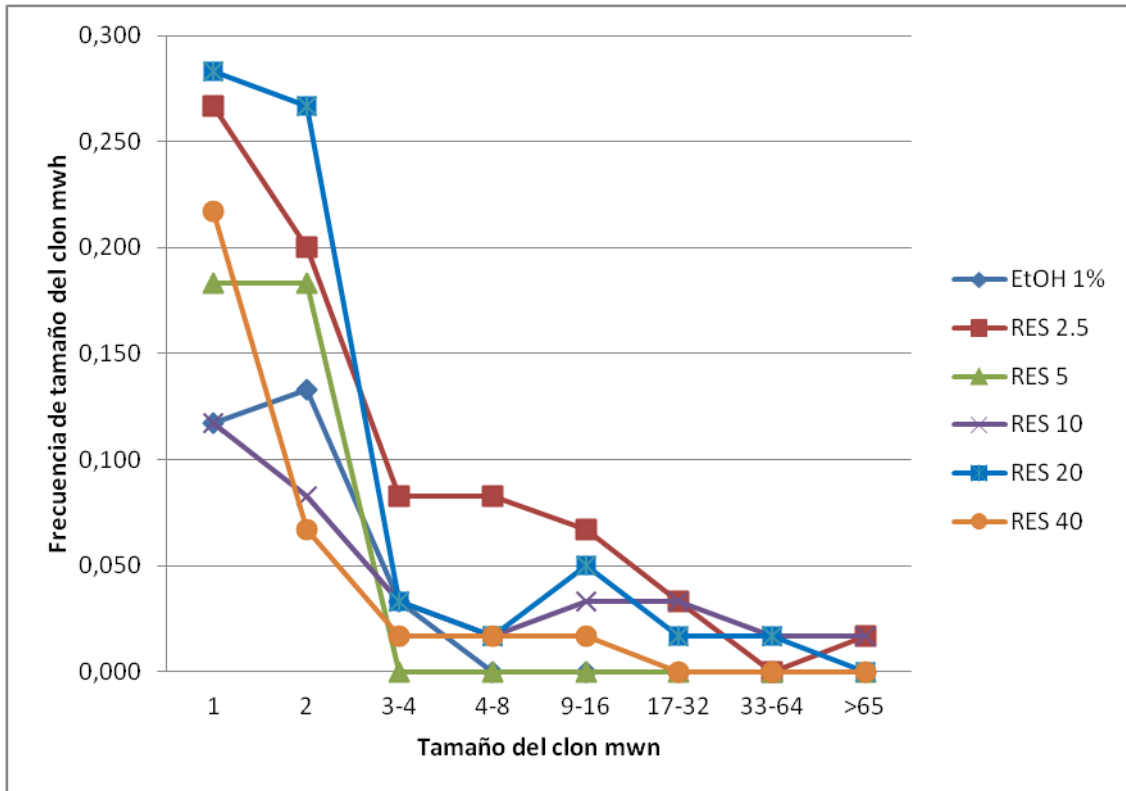
*Diagnóstico estadístico de acuerdo con Frei y Würigler (1988, 1995) comparados con su testigo correspondiente: -, negativo;+, positivo; m, factor de multiplicación de riesgo mínimo para asignar un resultado positivo ($p < 0.05$)



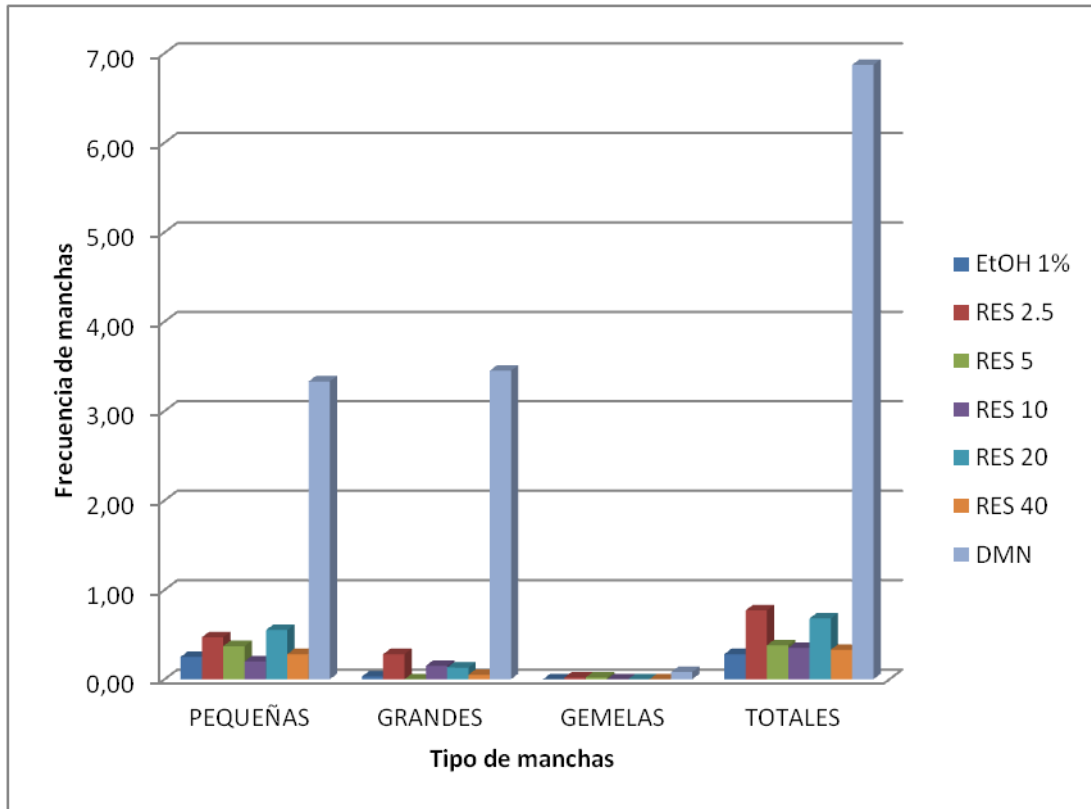
Gráfica 1. En esta gráfica se observa la frecuencia de manchas pequeñas, grandes y totales a las cinco concentraciones de RES. Se puede ver que a cualquier concentración las manchas pequeñas se mantienen por encima de las grandes y no presenta tendencia, por lo que se observa un efecto independiente de la concentración.



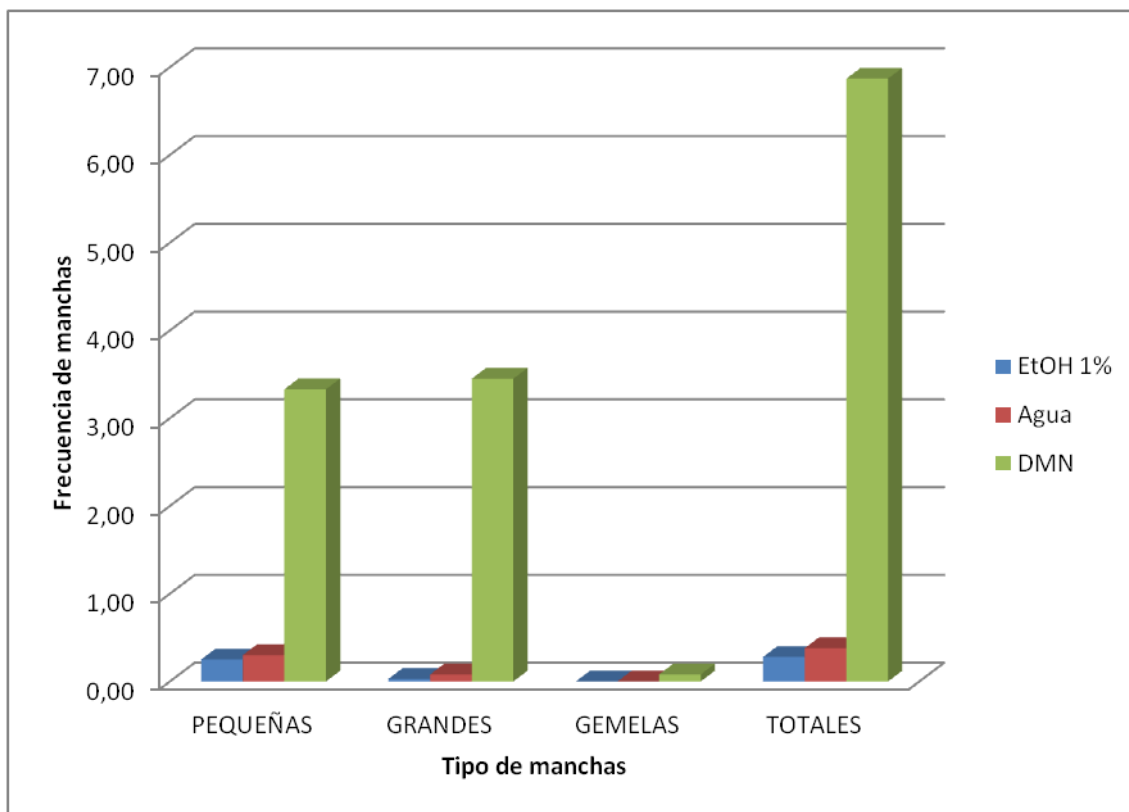
Gráfica 2. Frecuencia de tipos de manchas de los tratamientos RES (2.5, 5, 10, 20 y 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$). La frecuencia de manchas por individuo de los tratamientos de RES (2.5, 5, 10, 20 y 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$) se muestra comparados contra el testigo negativo EtOH 1%. Las estrellas señalan los resultados positivos de acuerdo con Frei y Würzler (1988, 1995).



Gráfica 3. Tamaño de los clones *mwh* por individuo de la CE. Se indica el tamaño de los clones en los respectivos tratamientos de RES. Los tamaños de clones representan el número de divisiones que ocurrieron en las células somáticas mutantes [1(1), 2(2), 3(3-4), 4(5-8), 5(9-16), 6(17-32) 7(33-64)] del disco imagal del ala. Anexo I.



Gráfica 4. Frecuencia de tipo de manchas por individuo de los tratamientos RES comparados con los testigos negativo (EtOH 1%) y positivo (DMN). . Como se esperaba, el testigo DMN tuvo una frecuencia alta en comparación con los tratamientos de RES y el testigo negativo EtOH 1%.



Gráfica 5. Frecuencia de tipo de manchas de los testigos. El testigo agua se utilizó para comparar el testigo DMN en la prueba SMART por lo que fue incluido. Se puede observar para todos los tipos de manchas una frecuencia alta del testigo DMN.

DISCUSIÓN

Existe una gran controversia acerca de los efectos que presenta el RES ya que muchos de los estudios proporcionan una visión muy atractiva de este compuesto para el consumo humano debido a que se muestra como una molécula con diversos efectos protectores, como son efectos antioxidantes, cardioprotectores o contra diferentes tipos de cáncer, por mencionar algunos. A pesar de su amplia aceptación también existe una contraparte para estos efectos benéficos a la salud los cuales exhiben efectos tóxicos y otros, que aún no han sido comprendidos del todo debido a la escasez de estudios sobre genotoxicidad en organismos vivos, así como la evidencia de que puede presentar efectos que dañan a las células.

A diferencia de otros estudios sobre la genotoxicidad del RES, dentro de los cuales figuran los de Schmitt *et al.*, 2002; Mitrut *et al.*, 2009; Williams *et al.*, 2009 quienes encontraron daño genotóxico a una concentración mayor de 10 µg/mL, en diferentes tipos celulares utilizando ensayos como el de AC y de MN en cultivos celulares, el mayor efecto genotóxico en este estudio se encontró en la concentración más baja la cual fue de 2.5 µg/mL, aunque también se encontró daño genotóxico a concentraciones de 10 µg/mL (manchas grandes) y 20 µg/mL (manchas pequeñas). Las diferencias entre el presente estudio y otros trabajos (Matsuoka *et al.*, 2001; Schmitt *et al.*, 2002; Fukuhara *et al.*, 2007; Mitrut *et al.*, 2009; Williams *et al.*, 2009) podría deberse a que estos últimos fueron realizados en ensayos *in vitro* y la prueba SMART es *in vivo*. Es importante mencionar que el efecto genotóxico que presentó el RES fue débil (3.6 veces mayor que el testigo negativo) en comparación con el testigo positivo (24 veces mayor que el testigo negativo).

La reducción en la frecuencia de las manchas pequeñas y grandes en la concentración 5 µg/mL al compararla con la concentración 2.5 µg/mL podría indicar un efecto protector del RES, pues incluso la frecuencia de manchas grandes es reducida a cero; esta suposición estaría respaldada en trabajos como los de Ignatowicz y Baer-Dubowska, 2001; Sgambato *et al.*, 2001; Krishna *et al.*, 2002; Bianco *et al.*, 2004; Baur y

Sinclair, 2006; Athar *et al.*, 2007; Shakibaei *et al.*, 2009 quienes indican que el RES posee efectos antioxidantes, quimiopreventivos y algunos efectos sobre el ciclo celular y la apoptosis. Aún más, la frecuencia de manchas en la siguiente concentración de RES (10 µg/mL) se mantiene por debajo de RES 5 µg/mL lo que podría indicar que este efecto protector por parte del RES se mantuvo.

Es importante hacer notar que la frecuencia de manchas aumentó con la concentración de 20 µg/mL resultados que concuerdan con los de Matsuoka *et al.*, 2001; Mitrut *et al.*, 2009; Williams *et al.*, 2009 donde encontraron que el RES inducía MN así como AC estructurales como rompimiento e intercambio de cromátides hermanas a esta concentración en modelos *in vitro*.

Por otro lado, se observó que RES 40 µg/mL disminuyó la frecuencia de todos los tipos de manchas comparado con los demás tratamientos, sin diferencias estadísticamente significativas contra el control negativo; dicha disminución podría explicarse si el RES hubiera actuado sobre algunas moléculas que intervienen sobre ciclo celular y la apoptosis (Matsuoka *et al.*, 2001; Sgambato, *et al.*, 2001; Schmitt *et al.*, 2002; Berardi, *et al.*, 2009) generándose la inducción de la reparación de daño o a la apoptosis, lo que concuerda con los trabajos realizados por Szende, *et al.*, 2000; García, *et al.*, 2012; Stocco, *et al.*, 2012 donde mencionan que a las concentraciones más altas que utilizaron en sus ensayos el RES presentó efectos antiproliferativos en modelos *in vitro*.

El RES presentó diferentes efectos según la concentración (Tabla 5, Gráficas 1 y 2) ya que se pueden observar efectos genotóxicos (2.5 y 20 µg/mL) efectos tempranos (10 µg/mL) o reductores, aparentemente antígenotóxicos (5 y 40 µg/mL).

La actividad de RES como un agente genotóxico se fundamenta en algunos estudios como el realizado por Pozo-Guisado, *et al.*, quienes en el 2005 probaron que el RES provocaba una pérdida significativa en el potencial de membrana de la mitocondria y un aumento de especies reactivas de oxígeno (ROS) lo que coincide con niveles bajos de Bcl-2 y NF-κB (proteínas antiapoptóticas) y la inducción de apoptosis (Figura 11). Además Juan, *et al.* (2008) mencionan que el efecto antitumoral del *trans*-resveratrol se da a través de una vía de la apoptosis dependiente de ROS. Stocco, *et al.*(2012)

propusieron que la diferente susceptibilidad a la muerte celular que se muestra inducida por diferentes dosis de RES es debida al estrés natural u oxidativo que está mediado por la modulación de la expresión de Bcl-2. Todos estos trabajos tienen en común que la inducción de la apoptosis está mediada por un mecanismo de respuesta al daño generado por el RES al aumentar las especies reactivas de oxígeno (generadas por la exposición a xenobióticos constituyen una fuente que genera daño en el DNA y comprometen la viabilidad celular) actuando sobre las moléculas blanco de este compuesto.

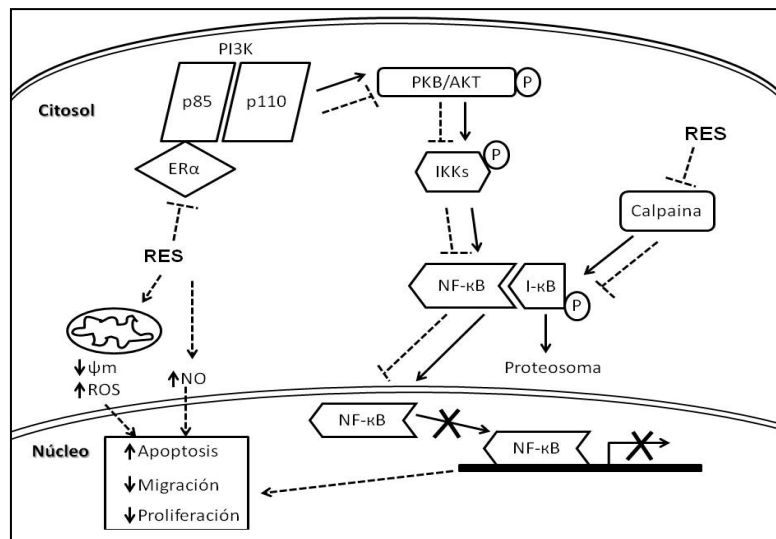


Fig. 11. Mecanismos de inducción de apoptosis de RES en células MCF-7. (Las líneas punteadas indican el efecto de RES sobre eventos de señalización). Modificado de Pozo-Guisado, *et al.*, 2005.

Se puede suponer entonces que los efectos del RES están mediados por los mecanismos en respuesta a los sistemas biológicos en la interacción y unión de este compuesto a diferentes moléculas blanco (Hsieh y Wu, 2010) lo que ayuda a explicar la diversidad de efectos que posee, en este caso la forma en cómo actuó el RES a las diferentes concentraciones propuestas en este trabajo podría ser prueba de que actúa de diferente manera debido a la vía celular que tome o molécula blanco a la que se

dirija. Sin embargo, es importante hacer notar la importancia de realizar más ensayos *in vivo* para poder comprender la forma en cómo se comporta el RES dependiendo de las vías que toma y/o sus moléculas objetivo y realizar co-tratamientos y pre-tratamientos para conocer más, tanto del metabolismo como la potenciación o disminución de la acción del RES en el organismo.

CONCLUSIONES

- ② El RES resultó positivo en la prueba SMART sin relación concentración-respuesta.
- ② El efecto del RES fue débil comparado con el testigo positivo (DMN).

REFERENCIAS

- Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR) U.S. Public Health Service In collaboration with U.S. Environmental Protection Agency (EPA), (1989). **Toxicological profile for n-nitrosodimethylamine.**
- Aguirre, M. S., (2010). **Biogerontología y mecanismos biológicos del envejecimiento.** En: **Envejecimiento humano: Una visión transdisciplinaria.** México: Instituto de Geriatria. ISBN 978-607-460-121-3; pp. 57 - 66.
- Amorós, G., (2001). **Estudio de mutantes del cromosoma III de *Drosophila melanogaster*: el gen *ash-2* como regulador de diferenciación celular.** Departamento de Genética de la Facultad de Biología, Universidad de Barcelona. pp. 165.
- Antón, A. y Lizaso J. **Nitritos, Nitratos y Nitrosaminas.** [En línea] Diciembre 2010 [Fecha de acceso: Septiembre: 2012] Accesible en:
- http://www.alimentariaonline.com/media/MLC039_nit.pdf
- Athar, M., Back, J., Tang, X., Kim, K., Kopelovich, L., Bickers, D. y Kim, A., (2003). **Resveratrol: A review of pre-clinical studies for human cancer prevention.** Toxicol Appl Pharmacol. Vol. 224(3), pp. 274 - 283.
- Bass, T., Weinkove, S., Houthoofd, C., Gems, D. y Partridge, L., (2007). **Effects of resveratrol on lifespan in *Drosophila melanogaster* and *Caenorhabditis elegans*.** Mechanisms of Ageing and Development. Vol. 128, pp. 546- 552.
- Bhat, K., y Pezzuto, J., (2002). **Cancer chemopreventive activity of resveratrol.** Ann. N.Y. Acad. Sci. Vol. 957, pp 210 - 229.
- Baur, J. y Sinclair, D., (2006). **Therapeutic potential of resveratrol: the *in vivo* evidence.** Nature Reviews; Drug discovery, Vol. 5, pp 493 - 506.
- Berardi, V., Ricci, F., Castelli, M., Galati, G. y Risuleo, G., (2009). **Resveratrol exhibits a strong cytotoxic activity in cultured cells and has an antiviral action**

against polyomavirus: potential clinical use. Journal of Experimental & Clinical Cancer Research. Vol. 28, 96.

- Brachmann, C., Sherman, J., Devine, S., Cameron, E., Pillus, L. y Boeke, J., (1995). **The SIR2 gene family, conserved from bacteria to humans, functions in silencing, cell cycle progression, and chromosome stability.** Genes Dev. Vol 9, pp. 2888 - 2902.
- Carmona, O., (2009). Tesis doctoral. **Evaluación genotóxica de algunos metales pesados en *Drosophila melanogaster* mediante los ensayos SMART de alas y cometa.** Universidad Autónoma de Barcelona. Facultad de Biociencias.
- Casarett y Doull, (2001). **Manual de Toxicología.** Ed. McGraw Hill Interamericana. 5ª ed. Traducido por Dr. Bernardo Rivera Muñoz. México. D. F. pp. 981.
- Castañeda, P., (2002). Tesis de maestría. **"Valoración genotóxica del acetato de plomo y la dimetilnitrosamina (DMN) en las cruas ab y st de *Drosophila melanogaster* pretratadas con fenobarbital, mediante la prueba de SMART".** Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Ciencias, UNAM.
- Castañeda, P., Heres, P. y Dueñas, G., (2008). ***Drosophila melanogaster*, un modelo experimental.** Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Estudios Superiores Iztacala. México D. F.
- Castañeda, P., Heres, P., Guzmán, R., Hernández, P., Dueñas, G., Durán, D. y Delfín, A., (2011). **Lead acetate does not inhibit dimethylnitrosamine activation and interacts with phenobarbital which is genotoxic in the ST cross of the *Drosophila* wing spot test.** *Food Chem Toxicol.* Vol 49:9,2172.
- Deepa, P., Priyanka, V., Swarna, R. y Akshaya, S, (2012). **Genotoxicity of benzaldehyde in *Drosophila melanogaster* using the wing somatic mutation and recombination test (smart) and protein profiling.** International Journal of Medical and Clinical research. Vol. 3, pp. 195-198.
- Felício, L., Silva, E., Ribeiro, V., Miranda, C., Vieira, I., Passos, D., Ferreira, A., Vale, C., Lima, D., Carvalho, S. y Nunes, W, (2011). **Mutagenic potential and modulatory effects of the medicinal plant *Luehea divaricata* (Malvaceae) in**

- somatic cells of *Drosophila melanogaster*: SMART/wing.** Genetics and Molecular Research. Vol. 10, pp. 16-24.
- Frei, H. y Würigler, F., (1988). **Statistical methods to decide whether mutagenicity test data from *Drosophila* assays indicate a positive, negative, or inconclusive result.** *Mutat. Res.* Vol. 203, pp. 297 - 308.
 - Frei, H. y Würigler, F., (1995). **Optimal experimental design and sample size for the statistical evaluation of data from Somatic Mutation and Recombination Test (SMART) in *Drosophila*.** *Mutat. Res.* Vol. 334, pp. 247 - 258.
 - Friedberg, E., Wood, R., Walke, G., Schultz, R., Siede, W. y Ellenberger, T. (2006). **DNA repair and mutagenesis.** 2° Edición, Editorial ASM Press. USA. pp 1118.
 - Fuentes, L. y Quintero, R., (2010). **Modulación por solventes de la genotoxicidad inducida en el SOS chromotest por la mitomicina C y la 4-nitroquinolina-1-óxido: su importancia en estudios de antimutagénesis.** *latreia*, Vol. 23.
 - Fukuhara, K., Nakanishi, I., Matsuoka, A., Matsumura, T., Honda, S., Hayashi, M., Ozawa, T., Miyata, N., Saito, S., Ikota, N., y Okuda H., (2008). **Efecto de la sustitución de metilo en la propiedad antioxidante y genotoxicidad del resveratrol.** *Chem. Res. Toxicol.* Vol. 21, pp. 282 - 287
 - García, B., (2010). Tesis doctoral. **Evaluación de la actividad fotoprotectora y antioxidante de *Yucca periculosa* Baker.** Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Estudios Superiores Iztacala.
 - Garcia, P., Schmiedlin-Ren, P., Mathias, J., Tang, H., Christman, G., y Zimmermann, H. (2012). **Resveratrol causes cell cycle arrest, decreased collagen synthesis, and apoptosis in rat intestinal smooth muscle cells** *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 302:G326-G335.
 - García-Bellido, A., (1972). **Some parameters of mitotic recombination in *Drosophila melanogaster*.** *Mol. Gen. Genet.* Vol. 115, pp. 54 - 72.
 - Geer, W., Stephen, W., McKechnie, F., Bentleyj, M., Oakeshott, G. y Langevin, J., (1988). **Induction of alcohol dehydrogenase by ethanol in *Drosophila melanogaster*.** *Nutr. Vol.* 118, pp. 398 – 407.

- Graf, U., Wurgler, F., Katz, A., Frei, H., Juon, H., Hall y C., Kale, P., (1984). **Somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*.** *Environ. Mutagen.* Vol. 6, pp. 153–188.
- Graf, U., Frei, H., Kagi, A., Katz, A. y Wurgler, F., (1989). **Thirty compounds tested in the *Drosophila* wing spot test.** *Mutat. Res.* Vol. 222, pp. 359–373.
- Graf, U., Spanó, M., Rincón J., Abraham, S. y De Andrade, H., (1996). **The wing somatic mutation and recombination test (SMART) in *Drosophila melanogaster*: an efficient tool for the detection of genotoxic activity of pure compounds or complex mixtures as well as for studies on antigenotoxicity of pure compounds or complex mixtures as well for studies on antigenotoxicity.** *Environmental Mutagenesis Carcinogenesis.* Vol. 16, pp. 1 – 7.
- Gürbüz, M., Oral, E., Kizilet, H., Halici, Z. y Gulec, M., (2012). **Genotoxic evaluation of selective serotonin-reuptake inhibitors by use of the somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*.** *Mutat. Res.* Vol. 748, pp. 17-20.
- Guzmán-Rincón, J. y Graf, U. (1995). ***Drosophila melanogaster* somatic mutation and recombination test as a biomonitor.** In: **Biomonitoring and biomarkers as indicators of environmental change: a Handbook.** Edited by Butterworth, F. M., Corkum, L.D., and Guzmán-Rincón, J. (Eds) Plenum Publishing Corp. pp. 169 - 181.
- Hsieh, T. y Wu, M., (2010). **Resveratrol: Biological and pharmaceutical properties as anticancer molecule.** Department of Biochemistry and Molecular Biology, New York Medical College, Valhalla, International Union of Biochemistry and Molecular Biology, Inc. Vol. 36, pp. 360 – 369.
- Ignatowicz, E. y Baer-Dubowska, W., (2001). **Resveratrol, a natural chemopreventive agent against degenerative diseases.** *Pol. J. Pharmacol.* Vol.53, pp. 557 – 569.
- Jenkins, G., Doak S., Johnson G., Quick E., Waters E. y Parry J.. (2005). **Do dose response thresholds exist for genotoxic alkylating agents?.** *Mutagenesis,* Vol. 20. pp 389-398.

- Klaassen, C., Amdur, M. y Doull, J., (1986): **Casarett and Doull's Toxicology**. 3rd Ed.
- Lekli, I., Szabo, G., Juhasz, B., Das, S., Das, M., Varga, E., Szendrei, L., Gesztelyi, R., Varadi, J., Bak, I., Das, D. y Tosaki A., (2008). **Protective mechanisms of resveratrol against ischemia-reperfusioninduced damage in hearts obtained from Zucker obese rats: The role of GLUT-4 and endothelin**, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* Vol. 294, pp. 859 - 866.
- Liviac, M., (2010). **Riesgo genotóxico de los subproductos de la desinfección del agua**. Tesis doctoral, Universidad Autónoma de Barcelona. Departamento de genética y microbiología. pp. 273.
- McQuilton, P., St. Pierre, S., Thurmond, J. y the FlyBase Consortium, (2012). **FlyBase 101 – the basics of navigating FlyBase**. *Nucleic Acids Res.* **40** (Database issue):D706-14. http://flybase.org/static_pages/allied-data/phylogeny/Drosophilidae-Tree/melanogastersubgroup.html
- Masten, S., (2002). **Trans-resveratrol [501-36-0] Review of Toxicological Literature**.
- Matsuoka, A., Furata, A., Ozaki, M., Fukuhara, K. y Miyata, N., 2001. **Resveratrol, a natural occurring polyphenol, induces sister chromatid exchanges in a Chinese hamster lung (CHL) cell line**. *Mutat. Res.* 494, 107–113
- Mendoza, T., Lopez, R. y Villa, T., (1985). **Genotoxicidad de diferentes cancerígenos a cultivos primarios de hepatocitos de ratas no tratadas o pretratadas con Aroclor 1254**. *Contam. Amb.* Vol. 1, pp. 25 - 33.
- Millán, P., Serrano, G. y Expósito, I., (2008). **Resveratrol. Nuevos retos en el tratamiento contra el envejecimiento**. Dossier; Adjunto del Servicio de Dermatología. Hospital Arnau de Vilanova. Clínica Dermatológica “Dr. Serrano”. Valencia.
- Misra, R. y Waalkes, M., (1998). **Enciclopedia de salud y seguridad en el trabajo**. Ministerio de Trabajo y Asuntos Sociales Subdirección General de Publicaciones.
<http://www.insht.es/portal/site/Insht/menuitem.1f1a3bc79ab34c578c2e888>

[4060961ca/?vgnnextoid=a981ceffc39a5110VgnVCM100000dc0ca8c0RCRD&vgn
extchannel=9f164a7f8a651110VgnVCM100000dc0ca8c0RCRD](https://doi.org/10.1007/978-94-007-1644-7_16)

- Mitrut, P., (2009). **The genotoxicity study of resveratrol in primary gastric adenocarcinoma cell cultures.** Romanian Journal of Morphology and Embryology. Vol. 50(3), pp. 429–433.
- Murillo-Romero, S. (1997). **Tesis profesional. Efecto de la capacidad de inducción de la activación metabólica del etanol y del ciclohexanol frente al daño producido por la N, N-Dimetilnitrosamina en *Drosophila melanogaster*.** Biología. Facultad de Ciencias. UNAM.
- Orsilin, P., Silva, O. y Nepomuceno, J., (2012). **Assessment of the mutagenic, recombinogenic and carcinogenic potential of orlistat in somatic cells of *Drosophila melanogaster*.** Food and Chemical Toxicology. Vol 50, pp. 2598-2604.
- Planas, J., Colom, H. y Emilia, M., (2011). **Resveratrol: A polyphenol with multiple effects.** Recent Advances in Pharmaceutical Sciences, pp. 101-120.
- Pozo-Guisado, E., Merino, M., Mulero-Navarro, S., Lorenzo-Benayas, J., Centeno, F., Alvarez-Barrientos, A. y Fernandez, S., (2005). **Resveratrol-induced apoptosis in MCF-7 human breast cancer cells involves a caspase-independent mechanism with downregulation of Bcl-2 and NF-kB.** Int. J. Cancer. Vol. 115, pp. 74 - 84.
- Robertis, E., (1960). **General cytology.** 3° Edición. Ed. Saunders. USA. pp 555.
- Rodríguez, R., (1995). **Las toxinas y sus efectos genéticos.** Fondo de cultura económica, México D. F. pp 95.
- Rose, L. y Hodgson, E., (2004). **A Textbook of Modern Toxicology.** 3° Edicion, edited by Ernest Hodgso. USA, pp. 638.
- Rubin, G., (1988). ***Drosophila melanogaster* as an experimental organism.** *Science.* Vol. 240, pp. 1453 - 1459.
- Russell, P., (1998). **Genetics.** The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc. Fifht Edition U.S.A., pp.805.
- Santos, C., (2006). Tesis de licenciatura. **“Interacción del Brócoli (*Brassica oleracea*, var. itálica) – uretano (carbamato de etilo) en la Prueba de**

Mutación y Recombinación Somáticas (SMART) en ala de *Drosophila melanogaster*". Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Estudios Superiores Iztacala.

- Schmitt, E., Lehmann, L., Metzler M. y Stopper, H., (2002). **Hormonal and genotoxic activity of resveratrol**. Toxicology Letters. Vol. 136, pp. 133 - 142.
- Shakibaei, M., Kuzhuvilil B., y Bharat B., (2009). **Resveratrol addiction: To die or not to die**. Mol. Nutr. Food Res. Vol. 53, pp. 115 - 128.
- Siede W, Friedberg AS y Friedberg EC. (1993). **RAD9-dependent G1 arrest defines a second checkpoint for damaged DNA in the cell cycle of *Saccharomyces cerevisiae***. Proc. Natl. Acad. Sci Genetics. Vol;90, pp.7985-7989.
- Sgambato, A., Ardito, R., Faraglia, B., Boninsegna, A., Wolf, F. y Cittadini. A., (2001). **Resveratrol, a natural phenolic compound, inhibits cell proliferation and prevents oxidative DNA damage**. Mutation Research Vol: 496, pp. 171–180
- Stoccoa, B., Toledoa, K., Salvadora, M., Pauloa, M., Koyamaa, N., Regina, M. y Toloia, T., (2012). **Dose-dependent effect of Resveratrol on bladder cancer cells: Chemoprevention and oxidative stress**. Maturitas Vol. 72, pp. 72–78.
- Szende B, Tyihak E y Kiraly-Veghely Z. (2000). **Dose-dependent effect of resveratrol on proliferation and apoptosis in endothelial and tumor cell cultures**. Experimental & Molecular Medicine; Vol: 32, pp.88–92.
- Tomoe, N., Teruko, S., Kazuo, F. y Hikoya, H., (1990). **The genotoxicities of N-nitrosamines in *Drosophila melanogaster* in vivo: the correlation of mutagenicity in the wing spot test with the DNA damages detected by the DNA-repair test**. Mutation Research. Vol. 252, pp. 119 - 128.
- Williams, L., Burdok G., Edwards J. Beck M. y Bausch J. (2009). **Safety studies conducted on high-purity transresveratrol in experimental animals**. Food Chem Toxicol Vol: 47, pp. 2170-2182.
- Windholz, M., Budavari, S., Streumtsos, L. y Noetherferting, M., (1995). **“The Merck Index” An encyclopedia of chemicals and drugs**. 9° edición. Ed. Merck and Co., Inc. Rahway, N.J., U.S.A.

- Wolf, T., Niehaus-Rolf, C. y Luepke, N., (2003). **Investigating genotoxic and hematotoxic effects of N-nitrosodimethylamine, N-nitrosodiethylamine and N-nitrosodiethanolamine in the hen's egg-micronucleus test HET-MN.** Food Chem Toxicol. Vol. 41, pp. 561 - 573.
- Yang, S., Brady, F. y Hong, J., (1992). **Dietary effects on cytochromes P450, xenobiotic metabolism, and toxicity.** The FASEB journal. Vol. 6, pp. 737 - 744.

ANEXO I

Drosophila melanogaster

El macho es más pequeño y los tres últimos segmentos abdominales están fusionados lo que le da la apariencia de una mancha negra en la punta del abdomen. Sin embargo una característica física para distinguirlos sin problema alguno son los peines sexuales que posee el macho en el primer par de patas; a menor distancia tienen el aspecto de puntos negros, pero son un conjunto de 10 a 12 cerdas gruesas y sirven para sujetar a la hembra durante la cópula. Las hembras son más grandes y el abdomen termina en forma de corazón (Figura 12) (Amorós, 2001).

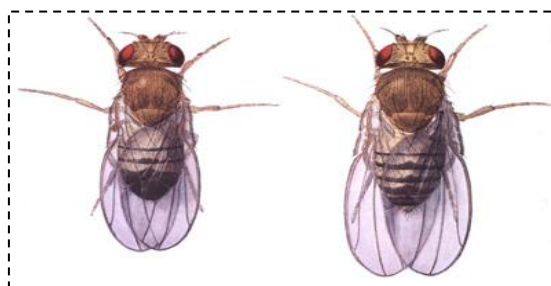


Fig. 12. *D. melanogaster* macho y hembra respectivamente (Tomado de: <http://www.ucm.es/info/genetica/grupod/Genenzima/Genenzima.htm>).

EL CICLO DE VIDA DE *Drosophila melanogaster*

El ciclo de vida de este organismo proporciona una ventaja para la investigación científica ya que presenta varios estados de desarrollo que pueden ser expuestos a diversos tratamientos experimentales. Las principales ventajas como organismo modelo se centran fundamentalmente en un tiempo de generación corto, una abundante descendencia y un fácil mantenimiento debido a sus reducidas dimensiones (Castañeda, *et al.*, 2008).

Drosophila melanogaster es un insecto holometábolo, es decir, presenta unas etapas larvianas y una etapa adulta separadas por una etapa pupal, durante la cual tiene lugar una metamorfosis completa. El ciclo de vida de *Drosophila* dura unos 10 días a 25°C (Figura 13). El huevo se forma durante un período de aproximadamente 3 días y medio. Una vez fecundado, la madre lo deposita en el exterior, después de unas 24 horas, el embrión eclosiona dando lugar a una larva de vida libre que pasará por 3 etapas larvianas. A los 5 días la larva entra en pupación y se inicia la metamorfosis. Durante esta etapa, la mayoría de tejidos larvianos son lisados. Las estructuras adultas se formarán principalmente a partir de la reorganización de los discos imaginales (que darán lugar a las estructuras epidérmicas de la cabeza, tórax y genitales externos del adulto) y los histoblastos (que formarán la epidermis abdominal del adulto). A las pocas horas de vida, la mosca adulta es fértil y se inicia de nuevo el ciclo vital (Amorós, 2001).

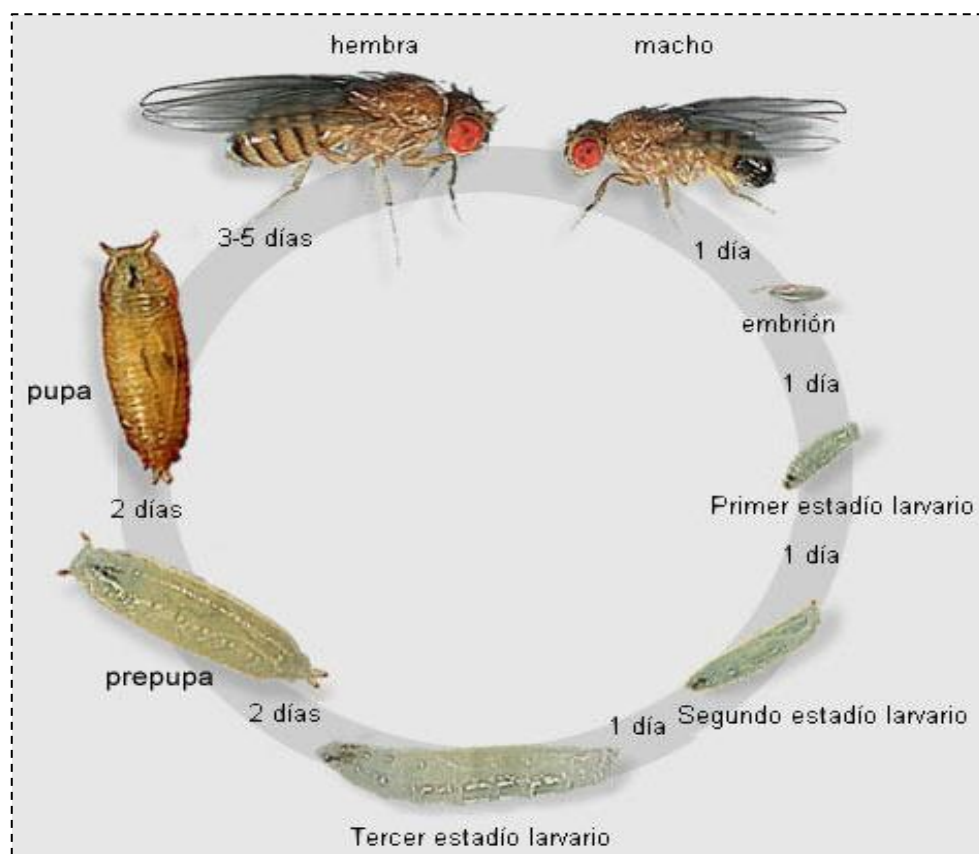


Fig. 13. Ciclo de vida de *D. melanogaster* (Tomado de: <http://www.ucm.es/info/genetica/grupod/Genenzima/Genenzima.htm>)

DISCOS IMAGINALES

Los discos imaginales son bolsas epiteliales que inicialmente tienen 20 a 50 células que aumentan por mitosis en número de miles durante la fase larvaria. Estas células darán lugar a diferentes estructuras en el adulto (Figura 14).

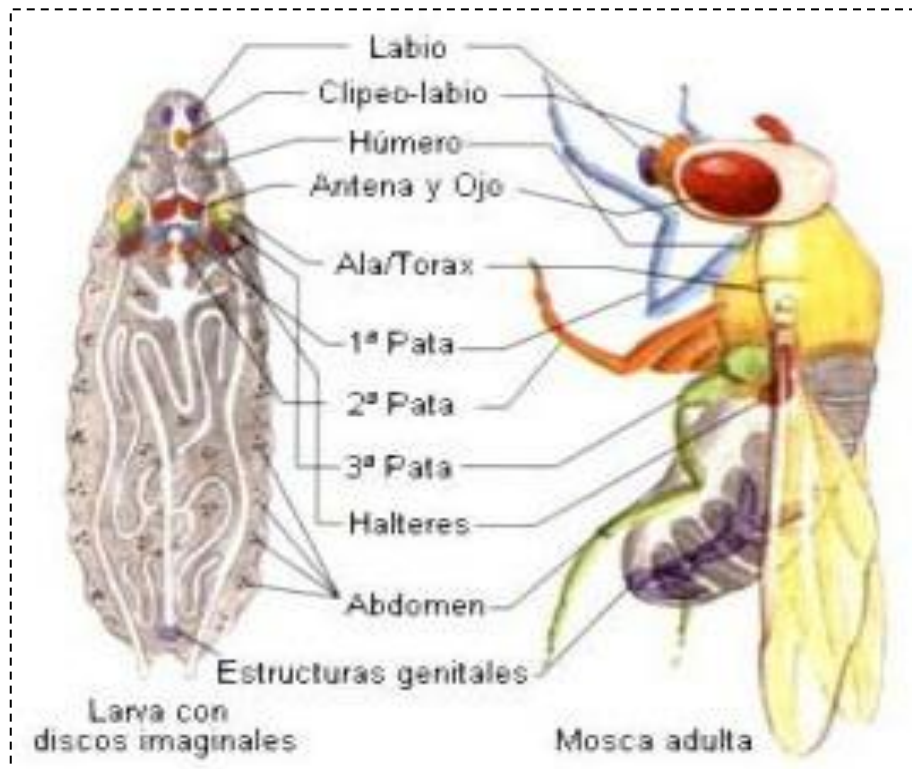


Fig. 14. Discos imaginales y estructuras adultas que forman (Tomado de: <http://www.ucm.es/info/genetica/grupod/Genenzima/Genenzima.htm>)

ANEXO II

SMART (SOMATIC MUTATION AND RECOMBINATION TEST)

Una de las formas de evaluar la genotoxicidad en eucariontes es mediante la prueba de mutación y recombinación somáticas (SMART) la cual ha demostrado ser eficaz en la detección de agentes genotóxicos (Felício *et al.*, 2011, Deepa *et al.*, 2012, Gürbuzel *et al.*, 2012, Orsolin, 2012).

La prueba SMART detecta mutaciones puntuales, aneuploidías y recombinaciones somáticas provocadas por la exposición a distintas concentraciones de algún agente químico o físico, utilizando como modelo experimental a *Drosophila melanogaster* (Guzmán-Rincón y Graf, 1995). La recombinación somática fue descubierta en *D. melanogaster* por Stern en 1936 y su inducción por rayos X fue empleada para estudiar el desarrollo de los discos imagales en este organismo (García-Bellido, 1972).

Las investigaciones iniciales con la mosca de la fruta *D. melanogaster* fueron hechas en 1909 por el Dr. Thomas Hunt Morgan en la Universidad de Columbia, Nueva York (Rubin, 1988). Desde que T.H. Morgan y sus colaboradores Bridges, Sturtevant y Müller la eligieron como modelo, la mosca de la fruta ha sido una figura importante en la investigación para los genetistas y biólogos del desarrollo (ver Anexo I). Al ser un organismo eucariota y pluricelular, este insecto díptero es un excelente modelo experimental en Toxicología Genética. Presenta sólo cuatro pares de cromosomas claramente distintos unos de otros por su forma y tamaño. Se conoce todo su genoma y además presenta genes implicados en el metabolismo de xenobióticos y en la reparación de daños al DNA similares a los de los humanos (Russell, 1998; Friedberg *et al.*, 2006).

La prueba de mutación y recombinación somáticas en *D. melanogaster* se basa en la detección rápida y cuantificación de eventos mutacionales y recombinogénicos en células somáticas. Se han descrito dos sistemas de prueba diferentes, uno emplea marcadores en las alas y el otro emplea marcadores que afectan la pigmentación de los ojos. Esta prueba se fundamenta en la pérdida de heterocigosidad de los genes

marcadores en las células de los discos imagales de las larvas los cuales corresponden a los primordios celulares presentes en larvas y que dan lugar a diferentes partes del cuerpo durante el proceso de pupación (ver Anexo I) lo que causa la formación de clones o sectores de células mutantes que se expresarán como manchas distinguibles por su aspecto fenotípico en alas o en los ojos de las moscas adultas (Figura 5) (Carmona, 2009).

La prueba SMART en ala utiliza cepas mutantes de *D. melanogaster* con marcadores recesivos:

- *mwh/mwh* (*multiple wing hairs*): Cepa que presenta una mutación autosómica recesiva *mwh* localizada en el brazo izquierdo del cromosoma 3 a 0.3 unidades de mapa (3-0.3). En homocigosis total o en mosaicos somáticos tiene la expresión fenotípica de la aparición de tres o más tricomas por célula en lugar de uno, como es el caso del fenotipo silvestre (Graf *et al.*, 1996; 1984).
- *flr³ / TM3, Bd^S (flare3)*: Cepa que presenta la mutación autosómica recesiva *flr³* ubicada en el cromosoma 3 a 38.8 unidades de mapa (3-38.8). La expresión fenotípica son tricomas malformados y cortos en forma de "flama". En condición homocigota es letal por lo que esta línea posee el cromosoma balanceador TM3 con inversiones múltiples que le permiten mantenerse en heterocigosis; este cromosoma balanceador se reconoce indirectamente por la presencia del gen dominante *Bd^S* (*Beaded Serratia*), el cual se expresa presentando muescas en el borde de las alas (Graf *et al.*, 1996; Graf *et al.*, 1984).

La cruce estándar (CE) se realiza con hembras vírgenes de la línea *flr3/TM3, Bd^S* y con machos de la línea *mwh/mwh* (Graf *et al.*, 1989). La CE se caracteriza por tener regulada la expresión de los genes *cyp450*, en esta cruce se producen dos tipos de genotipos: transheterocigóticos *mwh, flr³⁺/mwh⁺, flr³* y heterocigóticos *mwh. flr³⁺/mwh⁺, flr³⁺*. Detecta principalmente mutágenos directos (Graf *et al.*, 1996), pero también puede detectar mutágenos indirectos o promutágenos.

PRUEBA DE MUTACIÓN Y RECOMBINACIÓN SOMÁTICAS EN ALA

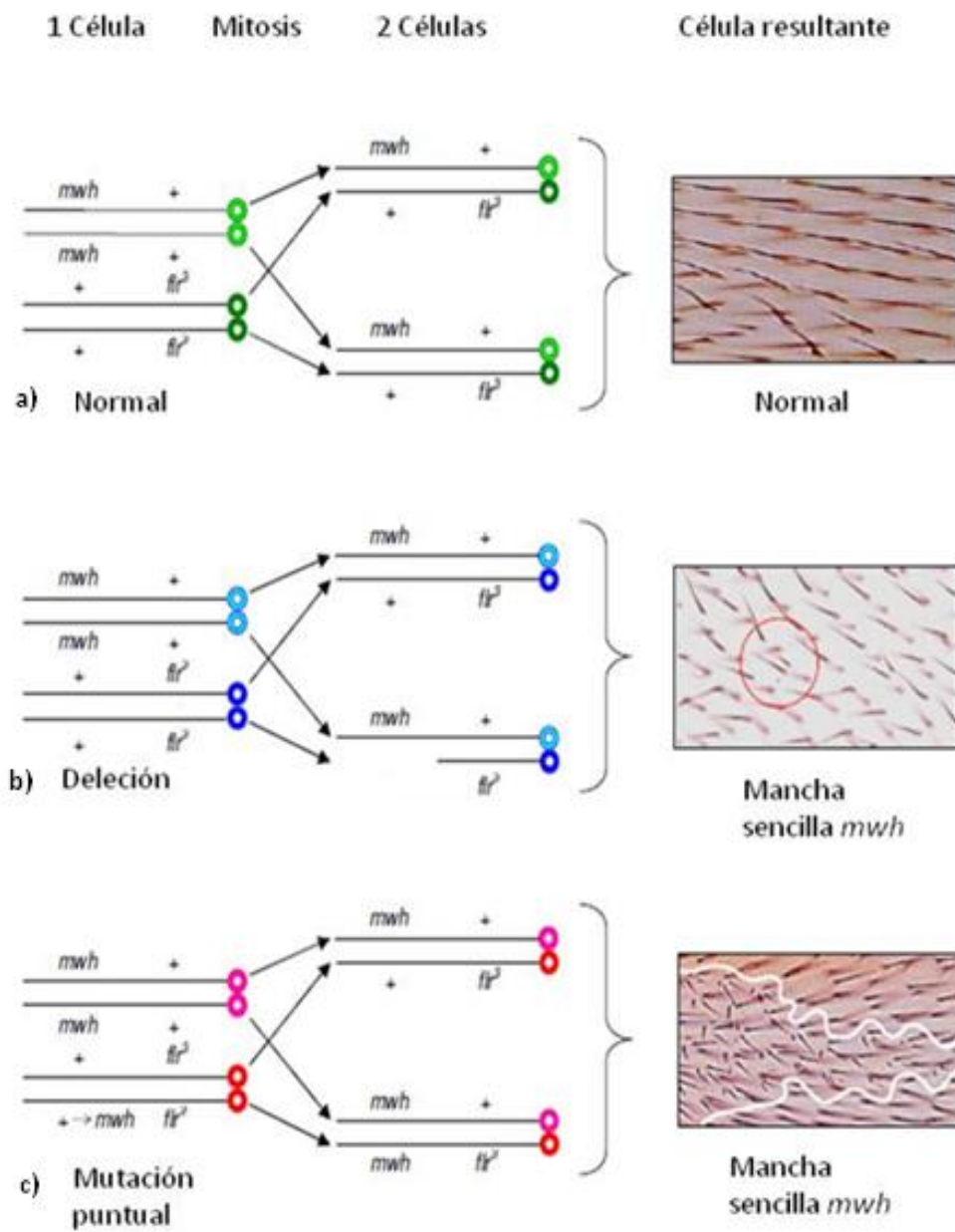


Fig. 5. Eventos genéticos que llevan a la pérdida de la heterocigosis y la formación de manchas en la prueba SMART (Modificado de Graf *et al.*, 1984). Donde a) segregación de cromátidas hermanas sin ningún evento que lleve a la pérdida de heterocigosis; b) Pérdida de heterocigosis por delección; c) pérdida de heterocigosis por mutación puntual.

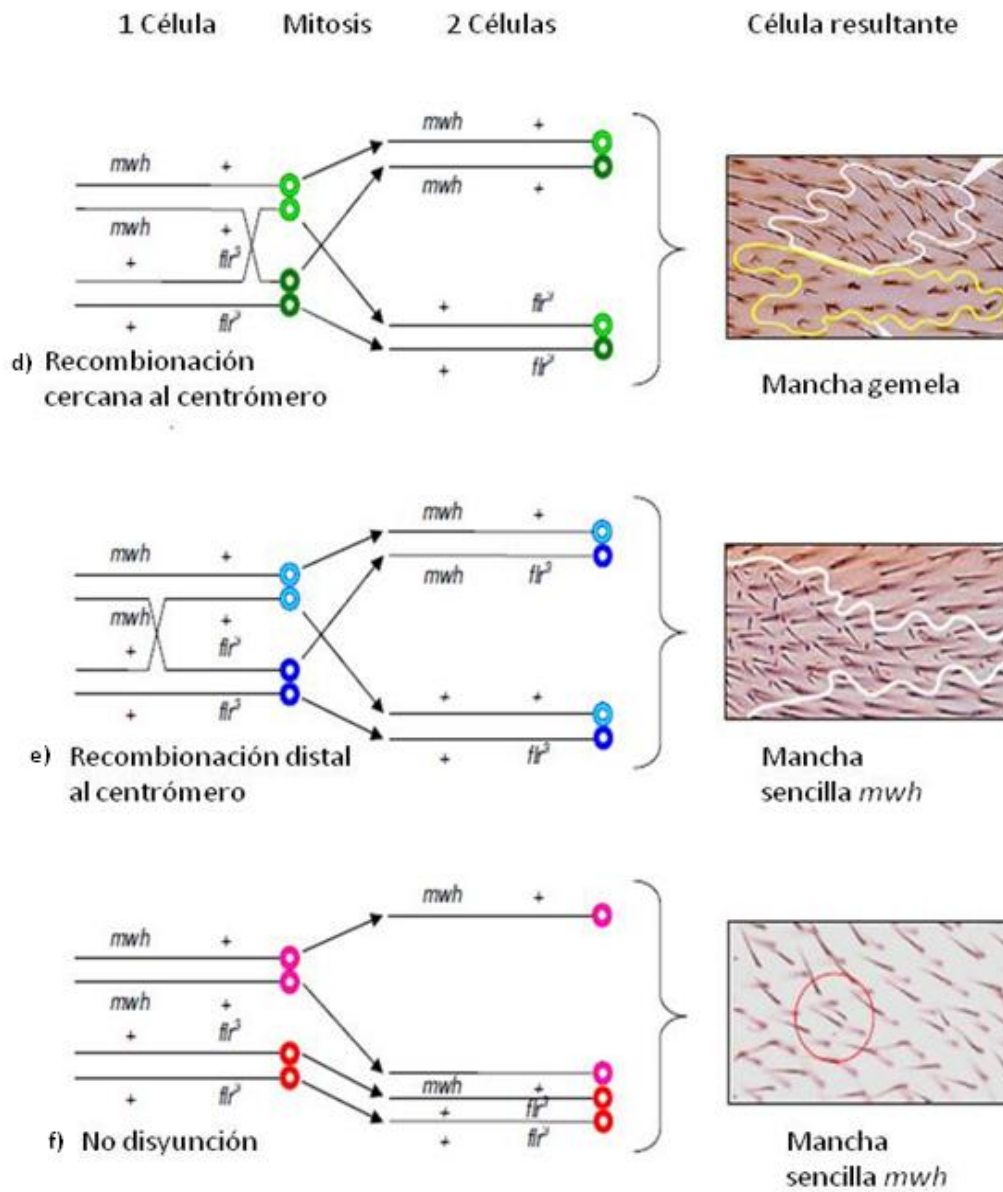


Fig. 5 (continúa). Eventos genéticos que llevan a la pérdida de la heterocigosis y la formación de manchas en la prueba SMART (Modificado de Graf *et al.*, 1984). Donde: d) pérdida de heterocigosis por recombinación somática cercana al centrómero; e) pérdida de heterocigosis por recombinación somática distal al centrómero y f) pérdida de heterocigosis por aneuploidía.

DISTRIBUCIÓN DEL TAMAÑO DE CLONES MUTANTES

El tamaño de las manchas analizadas refleja el número de divisiones celulares que ocurrieron después de la inducción del daño, espontáneo o inducido, en la célula afectada original, por lo que puede ser indicador indirecto de la actividad del compuesto y del momento en que alcanza a la célula blanco; así también indica si existe algún problema con la mitosis o si ocurrió muerte celular, lo cual se vería reflejado en la disminución en el tamaño y de las frecuencias. Los tamaños de la mancha corresponden a un número de divisiones (n) que va de 20 a $2n$ células, por lo que las clases del tamaño de clones se agrupan de la siguiente manera: 1, 2,3-4.5-8,9-16,17-32, 33-65 células. Las manchas pequeñas que se cuentan de 1-2 células mutantes y grandes de 3 en adelante (Graf *et al.*, 1984).

ANEXO III

PRUEBA U

Prueba no paramétrica U de Mann-Whitney y Wilcoxon donde solo se comparan los datos contra la hipótesis nula, usando el programa estadístico STAT Graphics versión 6.0.

Este programa nos da como resultado las tablas que se muestran abajo, de ellas se obtienen las Z ajustadas y dependiendo (Frei, comunicación personal) de:

- si el valor de Z ajustada es negativo entonces:

$$p/2 \begin{cases} \text{si } > 0.05 \text{ entonces no es significativo.} \\ \text{si } < 0.05 \text{ entonces es significativo.} \end{cases}$$

- si el valor de Z ajustada es positivo entonces:

$$1p/2 \begin{cases} \text{si } > 0.05 \text{ entonces no es significativo.} \\ \text{si } < 0.05 \text{ entonces es significativo.} \end{cases}$$

Resultado del testigo EtOH 1% con RES 2.5 µg/mL, Z ajustada es negativo para manchas pequeñas, grandes y totales siendo para los tres casos significativo.

Mann-Whitney U Test (Spreadsheet2)										
By variable Tratamiento										
Marked tests are significant at p < .05000										
variable	Rank Sum EtOH 1%	Rank Sum RES 2.5	U	Z	p-level	Z adjusted	p-level	Valid N EtOH 1%	Valid N RES 2.5	2*1sided exact p
pequeñas	3388.000	3872.000	1558.000	-1.27017	0.204025	-1.62450	0.104271	60	60	0.205760
grandes	3388.000	3872.000	1558.000	-1.27017	0.204025	-2.44246	0.014588	60	60	0.205760
gemelas	3630.000	3630.000	1800.000	0.00000	1.000000			60	60	
totales	3311.500	3948.500	1481.500	-1.67169	0.094586	-2.02774	0.042588	60	60	0.094672
clones	3311.500	3948.500	1481.500	-1.67169	0.094586	-2.02774	0.042588	60	60	0.094672

Resultado del testigo EtOH 1% con RES 5 µg/mL, Z ajustada es negativo para manchas pequeñas, grandes, gemelas y totales siendo para los tres casos no significativo.

Mann-Whitney U Test (Spreadsheet2)										
By variable Tratamiento										
Marked tests are significant at p < 05000										
variable	Rank Sum EtOH 1%	Rank Sum RES 5	U	Z	p-level	Z adjusted	p-level	Valid N EtOH 1%	Valid N RES 5	2*1sided exact p
pequeñas	3449.500	3810.500	1619.500	-0.947379	0.343446	-1.22901	0.219070	60	60	0.344726
grandes	3690.000	3570.000	1740.000	0.314918	0.752824	1.42019	0.155552	60	60	0.755682
gemelas	3600.000	3660.000	1770.000	-0.157459	0.874883	-1.00000	0.317311	60	60	0.877408
totales	3477.500	3782.500	1647.500	-0.800417	0.423470	-1.00927	0.312845	60	60	0.424848
clones	3477.500	3782.500	1647.500	-0.800417	0.423470	-1.00927	0.312845	60	60	0.424848

Resultado del testigo EtOH 1% con RES 10 µg/mL, Z ajustada es negativo para manchas pequeñas, grandes y totales siendo para los tres casos no significativo.

Mann-Whitney U Test (Spreadsheet2)										
By variable Tratamiento										
Marked tests are significant at p < 05000										
variable	Rank Sum EtOH 1%	Rank Sum RES 10	U	Z	p-level	Z adjusted	p-level	Valid N EtOH 1%	Valid N RES 10	2*1sided exact p
pequeñas	3751.500	3508.500	1678.500	0.637710	0.523663	0.94918	0.342529	60	60	0.525018
grandes	3508.000	3752.000	1678.000	-0.640334	0.521956	-1.48136	0.138512	60	60	0.525018
gemelas	3630.000	3630.000	1800.000	0.000000	1.000000			60	60	
totales	3649.500	3610.500	1780.500	0.102348	0.918480	0.13727	0.890818	60	60	0.918785
clones	3649.500	3610.500	1780.500	0.102348	0.918480	0.13727	0.890818	60	60	0.918785

Resultado del testigo EtOH 1% con RES 20 µg/mL, Z ajustada es negativo para manchas pequeñas, grandes y totales siendo para los tres casos no significativo.

Mann-Whitney U Test (Spreadsheet2)										
By variable Tratamiento										
Marked tests are significant at p < 05000										
variable	Rank Sum EtOH 1%	Rank Sum RES 20	U	Z	p-level	Z adjusted	p-level	Valid N EtOH 1%	Valid N RES 20	2*1sided exact p
pequeñas	3428.000	3832.000	1598.000	-1.06023	0.289043	-1.37155	0.170203	60	60	0.291385
grandes	3569.000	3691.000	1739.000	-0.32017	0.748842	-0.84796	0.396462	60	60	0.751709
gemelas	3630.000	3630.000	1800.000	0.000000	1.000000			60	60	
totales	3416.500	3843.500	1586.500	-1.12058	0.262466	-1.39480	0.163077	60	60	0.263518
clones	3445.500	3814.500	1615.500	-0.96837	0.332858	-1.21592	0.224018	60	60	0.334117

Resultado del testigo EtOH 1% con RES 40 µg/mL, Z ajustada es negativo para manchas pequeñas, grandes y totales siendo para los tres casos no significativo.

Mann-Whitney U Test (Spreadsheet2)										
By variable Tratamiento										
Marked tests are significant at p < 05000										
variable	Rank Sum EtOH 1%	Rank Sum RES 40	U	Z	p-level	Z adjusted	p-level	Valid N EtOH 1%	Valid N RES 40	2*1sided exact p
pequeñas	3549.500	3710.500	1719.500	-0.422515	0.672649	-0.567784	0.570182	60	60	0.673742
grandes	3600.000	3660.000	1770.000	-0.157459	0.874883	-0.454925	0.649164	60	60	0.877408
gemelas	3630.000	3630.000	1800.000	0.000000	1.000000			60	60	
totales	3543.000	3717.000	1713.000	-0.456632	0.647936	-0.587159	0.557098	60	60	0.650971
clones	3572.000	3688.000	1742.000	-0.304421	0.760807	-0.395342	0.692591	60	60	0.763648

Aberración cromosómica: Anomalía que influye en el número o composición de los cromosomas.

Anueploidía: Anomalía numérica que afecta a uno o varios cromosomas, pero no a todo el genoma.

Apoptosis: Es la muerte celular programada, que puede ser ocasionada por el daño excesivo a la célula.

Cáncer: Se caracteriza por el aumento descontrolado de la proliferación celular e inhibición de la apoptosis.

Cepa: Variante fenotípica de una especie.

Cromosoma: En eucariontes los cromosomas son agregados de DNA molecular lineal y proteínas llamadas histonas supercondensadas, que forman la cromatina.

Delección: Pérdida de un fragmento del cromosoma.

Diploide: Célula u organismo con dos complementos cromosómicos, de forma que posee un número total de cromosomas que es doble del haploide. El número diploide se representa por $2n$.

Fenotipo: El fenotipo constituye los rasgos observables de un individuo, tales como los transcritos, las proteínas, los organelos, los tejidos, la altura, el color de ojos, y el grupo sanguíneo.

Gen: Secuencia lineal de nucleótidos en la molécula de DNA o RNA (virus de RNA), que contiene la información necesaria para una función celular específica. Unidad de función mínima que puede heredarse.

Genotipo: Todos los genes que son heredados y pueden ser expresados o no.

Genotoxinas: Son compuestos químicos que dañan el DNA causando mutaciones genéticas (*mutágenos*), daños que no son reparados, contribuyendo al desarrollo de tumores cancerosos (*carcinógenos*) y causando defectos de nacimiento (*teratógenos*).

Heterocigoto: Individuo diploide que para un gen dado, tiene en cada uno de los cromosomas homólogos un alelo diferente.

Homocigoto: Individuo diploide donde alelos idénticos del gen están presentes en ambos cromosomas.

Imago: Estadio adulto.

Intercambio de cromátidas hermanas: Evento celular que se produce durante la fase S de la mitosis, se producen por ruptura y posterior reparación del DNA por recombinación entre homólogos (HRR).

Micronúcleos: Fragmentos de cromosomas o cromosomas completos que espontáneamente o de manera inducida por agentes químicos o físicos se separan del núcleo.

Mutación: Cambio heredable o potencialmente heredable que altera la posición, la clase, la secuencia o el número de nucleótidos en el DNA.

Mutación puntual: Se produce cuando se altera un solo par de bases, aunque también puede referirse a el cambio en un gen..

Mutágeno: Agente químico o físico, que promueve el daño en el DNA.

No-disyunción: Un fallo en la correcta separación de un par de cromosomas homólogos durante la división celular.

Recombinación somática: Sobrecruzamiento somático cuando el proceso de recombinación se produce entre dos cromosomas homólogos por HRR.

Tricomas: "Pelos" de las células epidermales.

Xenobiótico: Compuesto químico externo a un organismo vivo que interacciona con él, que requiere ser metabolizado por las Fases I, II y III del metabolismo xenobiótico.