



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

“EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD
MUTAGÉNICA DE LA
INTERACCIÓN DEL MMS, FeSO_4 Y
VITAMINA C CON LA PRUEBA
SMART EN ALA DE *Drosophila*
melanogaster (Progenie
Serratia)”.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

B I Ó L O G A

P R E S E N T A:

Ortiz Rodríguez Cindy Lorena

DIRECTOR DE TESIS

BIÓL: SANTOS CRUZ LUIS FELIPE



LOS REYES IZTACALA EDO. DE MÉX. 2015



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.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN.....	1
INTRODUCCIÓN.....	2
METIL METANOSULFONATO.....	3
VITAMINA C.....	4
SULFATO FERROSO.....	5
<i>Drosophila melanogaster</i>	6
PRUEBA SMART.....	7
ANTECEDENTES.....	9
JUSTIFICACIÓN.....	11
OBJETIVO GENERAL.....	11
OBJETIVO PARTICULAR.....	11
HIPÓTESIS.....	12
MATERIALES.....	12
QUÍMICOS.....	12
BIOLÓGICOS.....	12
MÉTODOS.....	13
DISEÑO EXPERIMENTAL.....	14
ANÁLISIS DE ALAS.....	15
ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	16
RESULTADOS.....	18
DISCUSIÓN.....	28
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	33
REFERENCIAS.....	34
ANEXO 1.....	38
ANEXO 2.....	39
ANEXO 3.....	41
ANEXO 4.....	42
ANEXO 5.....	43

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

FIGURA 1: Estructura química del Metil metanosulfonato (MMS).....	3
FIGURA 2: Estructura química de la vitamina C (Vit C).....	4
FIGURA 3: Reacción de Fenton.....	6
FIGURA 4: Ciclo de vida <i>D. melanogaster</i>	39
FIGURA 5: Solución conservadora.....	42
FIGURA 6: Dimorfismo sexual en <i>D. melanogaster</i>	43
FIGURA 7: Levadura activa.....	44
TABLA 1: Tratamientos y co-tratamientos crónicos (48 h) dados a larvas de 72 ± 4 h de edad cruce CE de la prueba SMART en ala de <i>D. melanogaster</i>	15
TABLA 2: Resultados de la prueba SMART en ala de <i>D. melanogaster</i> para la progenie heterocigota (<i>Serratia</i>) de la cruce CE, después del tratamiento crónico a larvas (72 ± 4 h) con Vitamina C (Vit C), Sulfato Ferroso (FeSO_4) y Metil metanosulfonato (MMS).....	19
TABLA 3: Continuación de resultados de la prueba SMART en ala de <i>D. melanogaster</i> para la progenie heterocigota (<i>Serratia</i>) de la cruce CE, después del tratamiento crónico a larvas (72 ± 4 h) con Vitamina C (Vit C), Sulfato Ferroso (FeSO_4) y Metil metanosulfonato (MMS)....	24

ÍNDICE DE GRÁFICAS

Gráfica 1: Frecuencia de manchas / individuos del testigo agua y tratamientos (Vit C, Vit C-FeSO ₄ y FeSO ₄) cruza E.....	18
Gráfica 2: Distribución de tamaño de clones mwh del testigo agua y tratamientos (Vit C, Vit C-FeSO ₄ y FeSO ₄) cruza E.....	20
Gráfica 3: Frecuencia de manchas / individuos del testigo agua y tratamientos (0.125, 0.250 y 0.375 MMS) cruza E.....	21
Gráfica 4: Distribución de clones / individuos del testigo agua y tratamientos (0.125, 0.250 y 0.375 MMS) cruza E.....	22
Gráfica 5: Frecuencia de manchas / individuos del testigo Vit C-FeSO ₄ y co-tratamientos (MMS 0.125 - Vit C- FeSO ₄ , MMS 0.250 - Vit C- FeSO ₄ y MMS 0.375 - Vit C- FeSO ₄) cruza E.....	23
Gráfica 6: Distribución de clones / individuos del testigo Vit C- FeSO ₄ y co-tratamientos (MMS 0.125 - Vit C- FeSO ₄ , MMS 0.250 - Vit C- FeSO ₄ y MMS 0.375 - Vit C- FeSO ₄) cruza E.....	25
Gráfica 7: Frecuencia de manchas / individuos de los testigos (MMS 0.125, MMS 0.250 y MMS 0.375) y co-tratamientos (MMS 0.125 - Vit C- FeSO ₄ , MMS 0.250 - Vit C- FeSO ₄ y MMS 0.375 - Vit C- FeSO ₄) cruza E.....	26
Gráfica 8: Distribución de clones / individuos de los testigos (MMS 0.125, MMS 0.250 y MMS 0.375) y tratamientos (MMS 0.125 - Vit C- FeSO ₄ , MMS 0.250 - Vit C- FeSO ₄ y MMS 0.375 - Vit C- FeSO ₄) cruza E.....	27

RESUMEN

Los seres vivos están expuestos a la acción de agentes físicos, químicos o biológicos, que pueden provocar efectos genotóxicos, un ejemplo es el Metil metanosulfonato (MMS), agente alquilante monofuncional directo que causa daños al DNA por metilación de bases y también genera especies reactivas de oxígeno (ROS). Para contrarrestar estos efectos se han usado compuestos con propiedades antioxidantes que contienden con los radicales libres. La vitamina C es un antioxidante capaz de evitar la acción nociva de los radicales libres; sin embargo, en algunas circunstancias puede ejercer efectos pro-oxidantes por medio de la formación de H_2O_2 , sobre todo en presencia de metales, tales como el Fe. Por tal motivo, el objetivo fue evaluar el efecto de la interacción Vitamina C – $FeSO_4$ sobre la acción del MMS en la progenie heterocigota (*Serratia*) de la cruce estándar (CE) de SMART en ala de *D. melanogaster*. Se trataron crónicamente larvas de 72 ± 4 h de edad con agua como testigo negativo, los tratamientos Vit C (5.6 mM), $FeSO_4$ (0.2 mM) y Vit.C- $FeSO_4$ (5.6 - 0.2 mM), los testigos positivos [MMS (0.125 mM), (0.250 mM) y (0.375 mM)], y co-tratamientos MMS - Vit C- $FeSO_4$. Los resultados indicaron que la interacción MMS 0.250 – vit C - $FeSO_4$ mostró efecto antimutagénico posiblemente debido a que la propiedad pro-oxidante de la vitamina C estimula la reparación del DNA. Las interacciones Vit C, Vit C - $FeSO_4$, MMS 0.125 mM - Vit C - $FeSO_4$ y MMS 0.375 - vit C - $FeSO_4$ no mostraron significancia y se proponen dos posibles razones de ello: (1) modulación entre la genotoxicidad del MMS y la inducción de sistema de reparación o (2) bloqueo de la metilación del MMS al DNA, por parte de la vitamina C.

INTRODUCCIÓN

Hoy en día los seres vivos están expuestos de manera constante e inevitable a la acción de numerosos agentes, sean físicos, químicos o biológicos, los cuales pueden llegar a provocar efectos tóxicos y/o genotóxicos (Rodríguez-Arnáiz, 1996).

La Genética Toxicológica es la disciplina científica que identifica y analiza la acción de agentes genotóxicos capaces de interactuar con el material genético de los organismos. Su objetivo primordial es detectar y entender las propiedades de estos agentes en los efectos hereditarios deletéreos o letales, estableciendo una correlación entre la exposición al agente y la inducción de alteraciones genéticas, tanto en las células germinales como somáticas de los organismos, y definir a partir de ello los efectos que las toxinas ambientales producen sobre la integridad genética de los seres vivos (Rodríguez-Arnáiz, 1996).

Durante varios años se ha estudiado la capacidad genotóxica (mutagénesis, recombinogénesis y clastogénesis) de diferentes agentes genotóxicos (Lehman *et al.*, 2000), un ejemplo de ello son los agentes alquilantes, compuestos que se usan en el tratamiento de neoplasias ya que pueden interferir con la división celular del tejido proliferante, por lo que su acción se considera citotóxica; adicionalmente han mostrado actividad genotóxica y cancerígena (Sobol *et al.*, 2007).

Los agentes alquilantes son compuestos electrofílicos con afinidad por los centros nucleofílicos de las macromoléculas orgánicas, por lo que transfieren grupos alquilo al DNA, RNA y proteínas (Jenkins *et al.*, 2005).

Metil metanosulfonato (MMS)

El Metil metanosulfonato (MMS) es un líquido incoloro extremadamente irritante, se ha utilizado como insecticida, solvente y como fármaco antineoplásico o citostático en tratamientos contra el cáncer (Jenkins *et al.* 2005).

Es un agente alquilante que tiene dos grupos metilo (Figura 1), es monofuncional porque sólo uno es donado a cualquier oxígeno o nitrógeno de las bases nitrogenadas, excepto en el N1 de las pirimidinas y el N9 de las purinas que se unen a la D-ribosa (Jenkins *et al.*, 2005). El MMS es un alquilante directo, porque no necesita ser metabolizado para causar daños al DNA o proteínas (Friedberg *et al.* 1995).

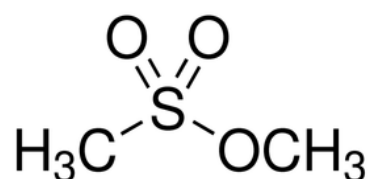


Figura 1. Estructura química del Metil metanosulfonato (MMS).

El MMS produce principalmente aductos N7-metilguanina (N7-MeG) en un 80%, N3-metiladenina (N3-MeA) en 10% y O⁶-guanosina (O6G) en un 0.3% (Jenkins *et al.*, 2005; Vogel, 1986). Estos aductos puede provocar la inhibición de la síntesis del DNA (Boiteux *et al.*, 1984), efectos clastogénicos (Vogel *et al.*, 1990), enlaces cruzados entre dos moléculas DNA-DNA, DNA-proteínas y rupturas de cadena que pueden generar aberraciones cromosómicas (Jenkins *et al.*, 2005). El daño produce de manera indirecta ROS principalmente $\cdot\text{OH}$ y H_2O_2 (Rowe *et al.*, 2008).

Vitamina C

Los antioxidantes como vitaminas, carotenos y minerales los podemos obtener naturalmente a través de la dieta o también se han añadido como suplementos a los alimentos, productos cosméticos y farmacéuticos. Los antioxidantes actúan como donadores de electrones, por lo que pueden neutralizar los radicales libres que puede dañar el DNA (Sayin *et al.*, 2014).

La vitamina C (2,3-didehidro-1-treohexano-1,4-lactona) (Figura 2) es un cofactor enzimático implicado en diversas reacciones fisiológicas, necesario para la síntesis de colágeno y glóbulos rojos, y el buen funcionamiento del sistema inmune (Shils *et al.*, 2002).

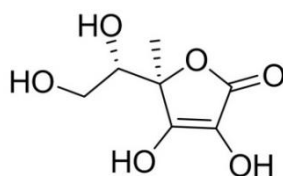


Figura 2. Estructura química de la Vitamina C.

La vitamina C ha sido reportada como un buen antioxidante ya que es capaz de contrarrestar la acción nociva de radicales libres y también se tiene propiedades antimutagénicas; sin embargo presenta efectos pro-oxidantes por medio de la formación de peróxido de hidrógeno (H₂O₂) (Sayin *et al.*, 2014). Este último efecto está relacionado con la presencia de metales, tales como el Hierro (Franke *et al.*, 2005).

La vitamina C también puede sufrir una reacción reversible de óxido-reducción que lo transforma en ácido dehidroascórbico (DHA), el cual también tiene actividades biológicas importantes, como antioxidante indirecto al aportar electrones para generar las formas reducidas de otros antioxidantes biológicos como flavonoides, glutatión y α -tocoferol (Shils *et al.*, 2002).

Sulfato ferroso (FeSO₄)

El sulfato ferroso es un compuesto utilizado como suplemento alimenticio, se disuelve rápidamente en el sistema digestivo y se libera como ion hierro II (Fe²⁺) (James *et al.*, 2007; Bacon y Briton, 1990).

El hierro es un elemento esencial para la vida, participa en todos los procesos de óxido-reducción. Lo podemos encontrar como transportador de electrones en los citocromos, participando con enzimas del ciclo de Krebs y del mantenimiento celular, tales como peroxidasas, catalasas y oxigenasas (Forrellat *et al.*, 2000). Sin embargo, al ser el hierro un elemento importante en moléculas que sufren reacciones redox también lo hacen potencialmente tóxico, ya que en estas reacciones se pueden generar especies reactivas del oxígeno (ROS), cuyos radicales libres pueden ocasionar daños en proteínas, lípidos y DNA (De Freitas y Meneghini, 2001).

La estructura química del hierro permite llevar a cabo reacciones de transferencia de un electrón, que lo hace importante en la producción y metabolismo de los radicales libres en sistemas biológicos. El hierro tiene la capacidad de reducir el oxígeno al radical superóxido (O₂⁻) (Fraga y Oteiza, 2002), cataliza la formación de oxirradicales, porque en la transferencia de un electrón al oxígeno genera radical superóxido (O₂⁻), que es precursor en última instancia del peróxido de hidrógeno (H₂O₂). Este a su vez, reacciona con el hierro (II) para producir un radical hidroxilo ([•]OH), por la denominada reacción de Fenton (figura 3) (Freitas y Meneghini, 2001).

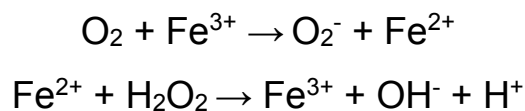


Figura 3. Reacción de Fenton.

Existen sustancias que pueden favorecer o inhibir la absorción del hierro, ejemplo son los agentes reductores, especialmente la vitamina C que impide la formación de los quelatos, lo que provoca un aumento de la absorción aún en presencia de inhibidores, esto determina la biodisponibilidad del hierro (Forrellat *et al.*, 2000).

Drosophila melanogaster

Uno de los modelos biológicos más utilizados en genética toxicológica es la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster*, díptero que ofrece una serie de ventajas tales como: (1) sistema de prueba eucariótico pluricelular, (2) fácil cultivo y manutención, (3) ciclo de vida corto que incluye 4 fases: huevo, larva, pupa y adulto (ver Anexo 1), (4) se conoce su genética y su posición filogenética, y (5) posee enzimas del metabolismo xenobiótico homólogas a las de los humanos (Rodríguez-Arnáiz, 1996, Ramos *et al.*, 1993; Castañeda *et al.*, 2008).

Prueba de Mutación y Recombinación Somática (SMART)

La Prueba de Mutación y Recombinación Somáticas (SMART) en ala de *D. melanogaster* es un bioensayo a corto plazo que se fundamenta en la pérdida de heterocigosis de marcadores de las células de los discos imaginales, provocada por el efecto de compuestos genotóxicos, y que se expresan como manchas de tricomas múltiples o mal formados en las alas de los organismos adultos (Spanó y Graf, 1998).

Esta prueba utiliza las líneas de *D. melanogaster*:

multiple wing hairs (*mwh/mwh*): presenta una mutación autosómica recesiva localizada en el brazo izquierdo del cromosoma 3 en posición 0.3 unidades de mapa (3-0.3). La expresión fenotípica es la aparición de tres a cinco tricomas por célula (Graf *et al.*, 1984; 1994).

flare (*flr³/TM3, Bd^s*): presenta una mutación autosómica recesiva ubicada en el cromosoma 3 en posición 38.8 unidades de mapa (3-38.8), más proximal al centrómero que *mwh*. La expresión fenotípica son tricomas mal formados y cortos en forma de “flama” o “roseta de maíz” (Graf *et al.*, 1984; 1996). Debido a que este marcador es letal en homocigosis, esta línea se construyó con un cromosoma balanceador con inversiones múltiples (TM3; Third multiple 3), que evita la recombinación en meiosis y permite mantener los marcadores letales en heterocigosis (Graf *et al.*, 1996). Para reconocer fenotípicamente el marcador *flr³*, la línea tiene el marcador dominante *Beaded Serratia (Bd^s)*. Este marcador se manifiesta con muescas en los bordes de las alas y se localiza en el cromosoma 3 (3-92.5) (Ramos *et al.*, 1993).

Con estas líneas se realiza la cruce estándar (CE) (Graf *et al.*, 1984) cruzando hembras vírgenes flare con machos multiple wing hairs (Guzmán y Graf, 1995; Graf *et al.*, 1984). La descendencia puede ser: moscas trans-heterocigotas con genotipo *mwh flr³⁺/ mwh+ flr³* y heterocigotas *mwh flr³⁺/ TM3, Bd^s*. Las trans-heterocigotas permiten detectar mutaciones por la expresión fenotípica de los marcadores sencillos *mwh* o *flr³*, así como también eventos de recombinación por la expresión de ambos marcadores adjuntos; la ausencia de la inversión multiple y el marcador *Bd^s* hace que se muestren alas de tipo silvestres. Las moscas heterocigotas solo permiten detectar mutaciones del marcador *mwh* debido a que estas no poseen el marcador *flr³*, en lugar de este último marcador se tiene la inversión múltiple y el marcador *Bd^s* expresada fenotípicamente con muescas en el borde del ala (serratia).

En SMART se pueden detectar varios eventos genéticos tales como mutación puntual, deleción y no disyunción en moscas heterocigotas, y además de los eventos señalados también recombinación distal y proximal al centrómero en moscas trans-heterocigotas (ver anexo 2).

Antecedentes

Yan y colaboradores (2014) valoraron el uso de la Vitamina C como complemento en la quimioterapia con Paclitaxel (alcaloide vegetal) y Carboplatino (agente alquilante) en pacientes con cáncer de ovario. Los resultados indicaron que el tratamiento con Vitamina C (2 mM) incrementó el daño al DNA en células SHIN3 (cáncer de ovario humano) mediante la generación de ROS, que en última instancia llevaron a procesos de apoptosis, necrosis, inactivación del ciclo celular y vías de señalización. El tratamiento combinado Vitamina C + Carboplatino + Paclitaxel redujo el peso del tumor en 94% en comparación con los controles.

Kaya y colaboradores (2002) evaluaron el efecto antígenotóxico de la Vitamina C (25, 75 y 250 mM) sobre el Cloruro de cobalto II (CoCl_2) [8 mM], 4-nitroquinolina 1-óxido (4-NQO) [3 mM] y dicromato de potasio ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$) [0.5 mM] en la prueba SMART en ala de *D. melanogaster*, craza CE. Los resultados indican que la Vitamina C no mostró genotoxicidad a ninguna concentración probada, mientras que en los co-tratamientos la Vitamina C redujo la genotoxicidad del $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$, no mostró efecto antígenotóxico sobre la genotoxicidad de 4-NQO y aumentó significativamente la frecuencia de clones mutantes provocado por el CoCl_2 .

Kaya (2003) evaluaron el efecto antígenotóxico de la Vitamina C (17 mM) con tres agentes alquilantes: MMS (0.1 mM), ENU (0.001 mM) y EMS (0.5 mM) en la prueba SMART en ala de *D. melanogaster*, craza BE. Los resultados indicaron que la Vitamina C redujo significativamente la frecuencia de manchas presentada por los tres agentes alquilantes. Propone que debido a que la Vitamina C o alguno de sus metabolitos pudieron formar un enlace con el mutágeno y evitar que éste se uniera a sitios nucleofílicos, tales como los del DNA.

Franke y colaboradores (2005) evaluaron el efecto reparador del pos-tratamiento Vitamina C (0.17 mM y 0.01 mM) del daño al DNA ocasionado por el MMS (0.279 mM), la Ciclofosfamida (89.5 mM) y FeSO₄ (0.21 y 0.15 mM) en la versión alcalina del ensayo cometa en células de sangre periférica de ratón. Los resultados mostraron que la vitamina C indujo un aumento significativo del daño al DNA generado por el FeSO₄, sólo la Vitamina C a la [0.01 mM] redujo la genotoxicidad de MMS, mientras que la Vitamina C incrementó el daño al DNA a las 24, pero no a las 48 h, lo que indica que promueve los sistemas de reparación del daño al DNA.

Arista (2008) evaluó el efecto genotóxico del MMS (0.5 mM), Vitamina C (5.6 mM), FeSO₄ (0.2 mM) y sus interacciones con la prueba SMART en ala de *D. melanogaster*. Los resultados para la CE indicaron que los tratamientos Vitamina C (5.6 mM), FeSO₄ (0.2 mM) solos o en combinación disminuyeron significativamente la frecuencia de manchas presentada por el tratamiento MMS posiblemente por una acción pro-oxidante.

Estrada (2008) evaluó el efecto genotóxico del MMS (0.125, 0.250 y 0.375 mM) con o sin Vitamina C (5.6 mM) y FeSO₄ (0.2 mM) con la prueba SMART en ala de *D. melanogaster*. Los resultados para la CE indicaron que la interacción de la Vitamina C - FeSO₄ redujeron significativamente la frecuencia de manchas del testigo MMS a las concentraciones 0.250 y 0.375 mM. En ese trabajo se propuso que los resultados fueron debido: a) el efecto pro-oxidante de vitamina C, lo que pudo haber modulado los sistemas reparación, o b) al efecto antioxidante de la Vitamina C.

Justificación

La importancia del uso de los quimioprotectores ha tomado mucha fuerza en los últimos años, ya que se ha visto que integrando a la alimentación algunos de ellos, tales como Licopeno, Sulforafano y Vitamina C, que se encuentran en el jitomate, coles y brócoli respectivamente, pueden actuar como antioxidantes y así disminuir el riesgo de enfermedades como el cáncer; sin embargo, esta propiedad puede ser modulada por los iones metálicos de transición. Por tal motivo, se decidió evaluar el posible efecto antimutagénico de la interacción Vitamina C - FeSO₄ sobre el mutágeno MMS.

Objetivo

Evaluar la actividad mutagénica de la interacción MMS, FeSO₄ y Vitamina C o en la cruce E de la prueba SMART en ala de *D. melanogaster*.

Objetivos particulares

- ❖ Determinar la frecuencia de mutaciones en moscas heterocigotas (*flr^s/TM3*, Bd^s) tratadas con MMS, FeSO₄, Vitamina C o la interacción de éstos.
- ❖ Reconocer si estos tratamientos modulan la división celular mediante el análisis de la distribución de clones mwh.

Hipótesis:

Si la vitamina C en conjunto con el FeSO_4 tiene efecto antimutagénico sobre el MMS, entonces encontraremos reducciones significativas en las frecuencias de manchas de los co-tratamientos Vitamina C - FeSO_4 - MMS con respecto al testigo MMS.

MATERIALES Y MÉTODOS

Químicos

- ❖ Metil metanosulfonato (MMS) 98% de pureza, CAS 66-27-3.
- ❖ Vitamina C 99% de pureza, CAS 50-81-7.
- ❖ Sulfato ferroso (FeSO_4) 99.99% de pureza, CAS 7782-63-0.
Obtenidos de Sigma (St Luis, MO, USA) y disueltos en agua desionizada.
- ❖ Medio instantáneo Carolina (MIC) obtenido en Carolina Biological Supply Company, Burlington N.C. USA.
Todas las soluciones se prepararon al momento de ser utilizadas.

Biológicos

Líneas mutantes de *D. melanogaster*:

- ❖ flare (*flr³/TM3, Bd^s*).
- ❖ multiple wing hairs (*mwh/mwh*).

Obtenidas del Laboratorio de Genética Toxicológica de la FES-Iztacala, UNAM, donadas originalmente por el Dr. Ulrich Graf del Instituto de Toxicología (Swiss Federal Institute of Technology) y de la Universidad de Zurich, Schwerzenbach, Suiza.

Métodos

Cultivo y propagación de las líneas mutantes de *D. melanogaster*.

Se cultivaron y propagaron las líneas mutantes multiple wing hairs y flare de *D. melanogaster* en frascos de 250 mL con 5 g de hojuelas de papa hidratadas con 20 mL de solución conservadora (Anexo 3), en una incubadora a 25 °C, humedad relativa de 65% y total oscuridad (Dueñas *et al.*, 2001).

Colecta de huevos

Se aislaron hembras vírgenes de las líneas flare y machos multiple wing hairs (Anexo 4) con los que se realizó la cruce estándar (CE). Esta se dejó tres días en medio de cultivo para asegurar el apareamiento de las moscas, posteriormente se preparó levadura fresca activada con sacarosa (Anexo 5) para hacer la colecta de huevos por 8 h, en una incubadora a 25°C, 65% humedad relativa y total oscuridad. Transcurrido este tiempo los padres fueron retirados y los frascos con la colecta de huevos fueron regresados a la incubadora. A las 72 ± 4 h se recuperaron las larvas diluyendo el medio de levadura en agua corriente a temperatura ambiente usando una coladera de malla fina de acero inoxidable.

Diseño Experimental

Se realizaron 3 experimentos independientes con 3 repeticiones por tratamiento colocando aproximadamente la misma cantidad de larvas de 72 ± 4 h de edad en tubos de ensayo con 0.5 g de Medio Instantáneo Carolina y 2 mL de los tratamientos: testigo negativo (agua), Vitamina C (5.6 mM), FeSO_4 (0.2 mM), Vit.C- FeSO_4 (5.6-0.2 mM), testigos positivos [MMS (0.125 mM), MMS (0.250 mM) y MMS (0.375 mM)], co-tratamientos [MMS-Vit.C- FeSO_4 (0.125-5.6-0.2 mM), MMS-Vit.C- FeSO_4 (0.250-5.6-0.2 mM) y MMS-Vit.C- FeSO_4 (0.375-5.6-0.2 mM)] (Tabla. 1). Éstos se incubaron a 25 °C, 65% humedad y total oscuridad hasta la emergencia de los imagos. Las moscas adultas se almacenaron en alcohol al 70%, se disectaron las alas de las moscas heterocigotas (fenotipo Serratia) y se montaron en preparaciones permanentes con la resina Entellan para su observación en el microscopio (40x).

Vega Contreras en 2005 determinó la concentración 0.5 mM como la CL_{50} de MMS en *D. melanogaster*. Para ver los efectos del MMS en este trabajo se utilizaron concentraciones proporcionales al 75%, 50% y 25% de la concentración original.

Tabla 1. Tratamientos y co-tratamientos crónicos (48 h) dados a larvas de 72 ± 4 h de edad cruza CE de la prueba SMART en ala de *D. melanogaster*.

TESTIGOS Y CO-TRATAMIENTOS	Agua	Vitamina C	FeSO ₄	MMS 0.125	MMS 0.250	MMS 0.375
Agua	❖					
Vitamina C (5.6 mM)	❖	❖				
Vitamina C-FeSO ₄ (0.2mM)	❖	❖	❖			
MMS 0.125 mM	❖			❖		
MMS 0.250 mM	❖				❖	
MMS 0.375 mM	❖					❖
MMS 0.125-Vit C-FeSO ₄	❖	❖	❖	❖		
MMS 0.250-Vit C-FeSO ₄	❖	❖	❖		❖	
MMS 0.375-Vit C-FeSO ₄	❖	❖	❖			❖

Análisis de manchas en las alas

Se revisaron las dos superficies de cada ala en el microscopio registrando el tipo y tamaño de mancha o clon encontrado (Graf *et al.*, 1984). Se reconocieron dos tipos de manchas: pequeñas (1-2 células) y grandes (>3 células), dado que en la progenie *Serratia* no ocurre la reparación por recombinación entre los homólogos (HRR) del par 3.

Los resultados fueron analizados con el programa SMART PC-versión 2.1 que analiza estadísticamente los resultados detectando las diferencias significativas entre los valores espontáneos del testigo correspondiente y las series de tratamientos experimentales. Este análisis está basado en la prueba no paramétrica de ji cuadrada para proporciones (de una cola), con un grado de libertad y una $p \leq 0.05$.

El 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): La frecuencia de mutación (inducida + espontánea) de los individuos tratados no es significativamente mayor a la frecuencia del testigo negativo.
- ❖ Hipótesis alternativa (H_a): La frecuencia de mutación (inducida + espontánea) de los individuos tratados es m veces mayor que la frecuencia del testigo negativo (Graf *et. al.*, 1984). Donde m , es el factor de multiplicación (derivados de trabajos con radiación) utilizado para realizar este análisis estadístico, indicando cuántas veces debe incrementarse el número de eventos de los tratamientos con respecto al testigo para considerar una respuesta positiva.

Las manchas pequeñas (1-2 células) son más comunes, por lo que predominan en relación con la frecuencia de manchas grandes (>3 células). De esta manera, para considerar un incremento significativo en la frecuencia de manchas pequeñas y totales (suma de todas las manchas) se utiliza $m=2$, mientras que para las manchas grandes

$m=5$ por ser menos comunes. Por ende son posibles las siguientes cuatro decisiones (Frei y Würigler, 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 : **indeciso**
4. Aceptar H_0 y aceptar H_a : **débil positivo**

Los resultados indecisos o débiles positivos, obtenidos con SMART fueron analizados con la prueba de U de Mann-Whitney y Wilcoxon, que considera la variabilidad de los individuos y no requiere una distribución normal de los datos, ya que es una prueba no paramétrica con modificaciones para dos colas para datos individuales; el resultado es significativo cuando $p \leq 0.05$.

El SMART para PC también permite determinar la distribución del tamaño de clones *mwh*, esta se agrupa en las diferentes variedades de tamaño de clones 1, 2, 3-4, 5-8, 9-16, 17-32 y 33-65 células y representa el número de divisiones (n) que van de 2^0 a 2^n células (Graf *et. al.* 1984).

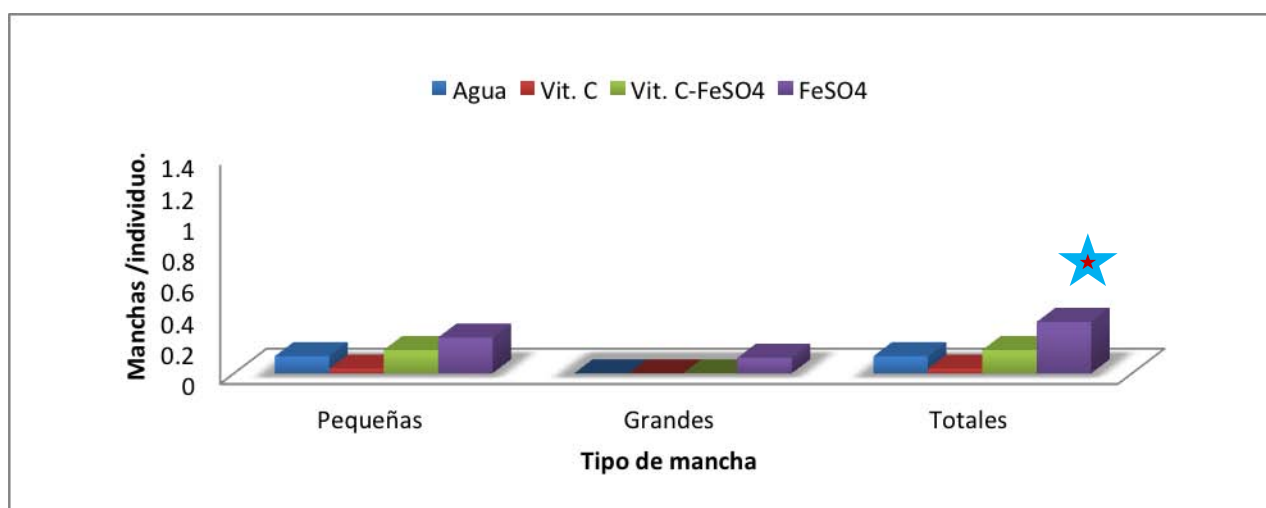
La prueba de Kolmogorov-Smirnov es aplicada para clones *mwh* permite medir el grado de concordancia entre dos distribuciones, comparando las frecuencias acumuladas de una distribución con las de otra, cuando el valor de $p \leq 0.05$. Los resultados indican si existen diferencias significativas entre ambas distribuciones y por lo tanto si una distribución es diferente a otra.

RESULTADOS

Cruza Estándar (CE)

En las Tablas 2 y 3 se muestran los resultados obtenidos del estadístico ji^2 de la prueba SMART para PC (Frei y Würigler, 1988) para la progenie heterocigota, después del tratamiento crónico a larvas (72 ± 4 h) con Agua, Vit C, $FeSO_4$ y MMS.

En la Tabla 2 inciso A y la Gráfica 1 se muestran las frecuencias de manchas por individuo para cada tipo de mancha del testigo agua (negativo) y los tratamientos Vit C, $FeSO_4$ y Vit C- $FeSO_4$. Comparando los tratamientos Vit C y Vit C- $FeSO_4$ contra el testigo agua no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en ningún tipo de mancha; mientras que el tratamiento $FeSO_4$ mostró un incremento significativo sólo en manchas totales.



★ Diferencias estadísticamente significativas.

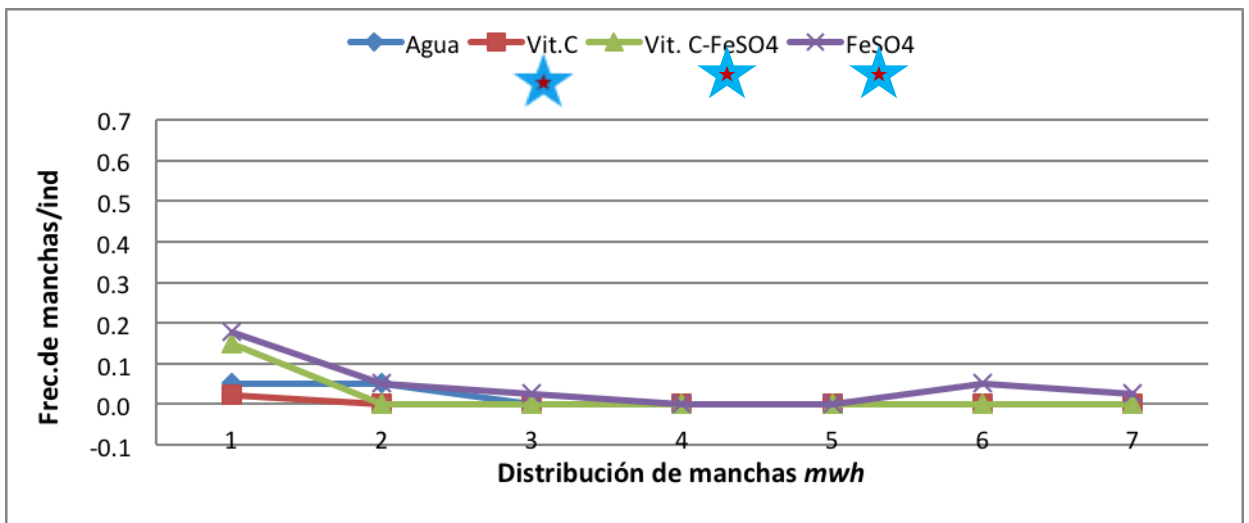
Gráfica 1. Frecuencia de manchas / individuos de testigo agua y tratamientos (Vitamina C, Vitamina C- $FeSO_4$ y $FeSO_4$) en la CE.

Tabla 2. Resultados de la prueba SMART en ala de *D. melanogaster* para la progenie heterocigota (*Serratia*) de la crucea CE, después del tratamiento crónico a larvas (72±4 h) con Vitamina C (Vit C), Sulfato Ferroso (FeSO₄) y Metil metanosulfonato (MMS).

Tratamiento (Concentración mM)	Número de moscas	Manchas por individuo (número de manchas) análisis estadístico*								
		Manchas pequeñas (1-2 células) m=2			Manchas grandes (> 2 células) m=5			Manchas totales m=2		
Cruza Estándar (CE)										
A.										
Agua	38	0.11	(4)		0.00	(0)		0.11	(4)	
Vit C (5.6)	40	0.03	(1)	i,ns	0.00	(0)	i,ns	0.03	(1)	i,ns
FeSO ₄ (0.2)	29	0.23	(9)	i,ns	0.10	(4)	i,ns	0.33	(13)	+
Vit C (5.6) + FeSO ₄ (0.2)	6	0.15	(9)	i,ns	0.00	(0)	i,ns	0.15	(9)	i,ns
B.										
Agua	38	0.11	(4)		0.00	(0)		0.11	(4)	
MMS 0.125	19	0.16	(3)	i,ns	0.05	(1)	i,ns	0.21	(4)	i,ns
MMS 0.250	20	0.50	(10)	+	0.20	(4)	+	0.70	(14)	+
MMS 0.375	40	0.62	(25)	+	0.47	(19)	+	1.10	(44)	+

* Diagnóstico estadístico de Frei and Würigler (1988), m = factor de multiplicación del riesgo mínimo para evaluar resultados negativos. Resultados: -, negativo; +, positivo; i, indeciso ($p < 0.05$) y Prueba de U de Mann-Whitney y Wilcoxon, donde ns= no significativo con $p \leq 0.05$.

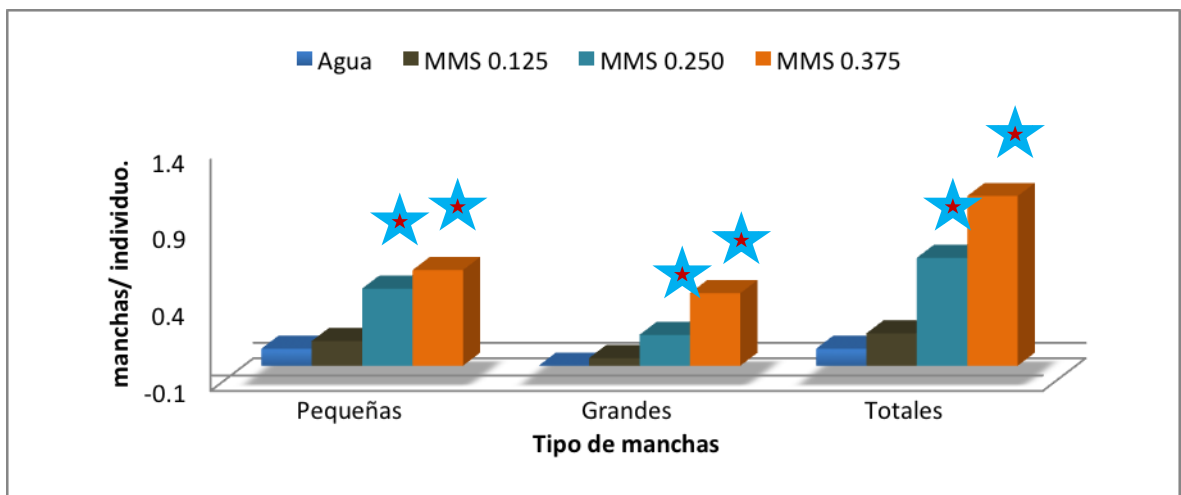
En la Gráfica 2 se muestra el análisis de la distribución de clones *mwh* donde se grafica la frecuencia de manchas por individuo contra el tamaño de clon *mwh*. Los resultados indican que existen diferencias estadísticamente significativas en las comparaciones del testigo agua contra los testigos Vit C, FeSO₄ y el co-tratamiento Vit C-FeSO₄.



★ Diferencias estadísticamente significativas entre los testigos y sus tratamientos correspondientes.

Gráfica 2. Distribución del tamaño de clones *mwh* del testigo agua y testigos (Vit C, Vit C-FeSO₄ y FeSO₄) CE. Los tamaños de los clones indican los eventos de división celular de los discos imaginales de las alas de *D. melanogaster* [1(1), 2(2), 3(3-4), 4(5-8), 5(9-16), 6(17-32) y 7(>33) células].

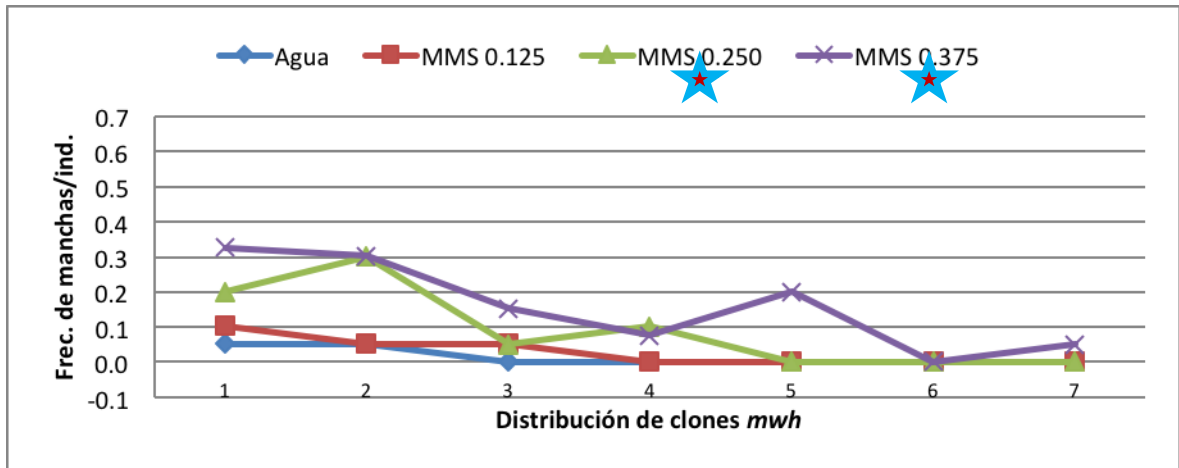
En la Tabla 2 inciso B y Gráfica 3 se muestra la comparación del testigo agua contra los tratamientos con MMS a las concentraciones 0.125, 0.250 y 0.375 mM, con un incremento significativo en manchas pequeñas, grandes y totales a las concentraciones de 0.250 y 0.375 mM.



★ Diferencias estadísticamente significativas.

Gráfica 3: Frecuencia de manchas / individuos del testigo agua y tratamientos (MMS 0.125, MMS 0.250 y MMS 0.375) en la CE.

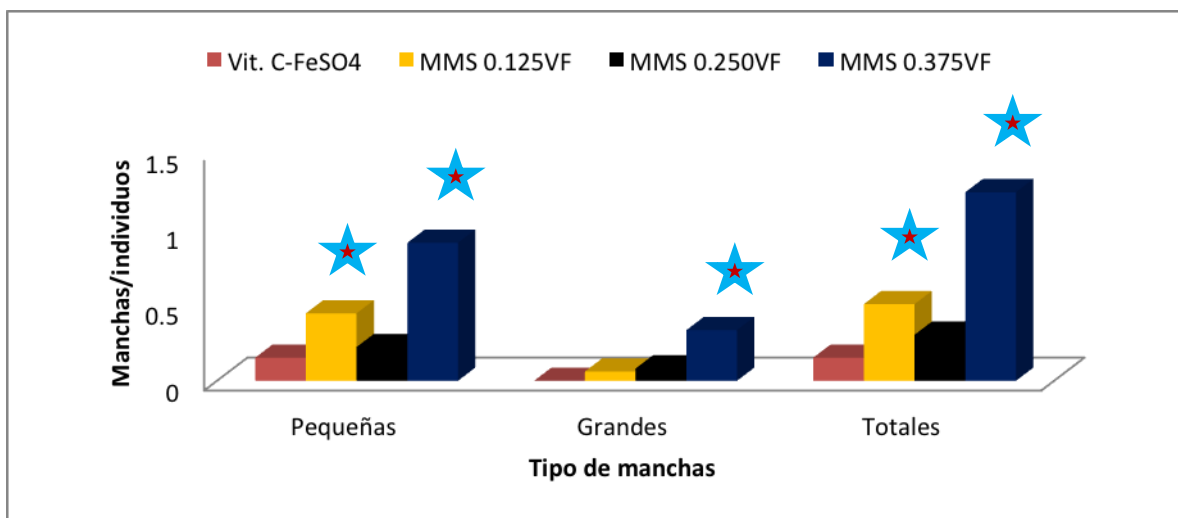
En la Gráfica 4 el análisis de distribución de clones *mwh* mostró diferencias estadísticamente significativas en las comparaciones de testigo agua contra los tratamientos MMS 0.250 y 0.375 mM.



★ Diferencias estadísticamente significativas entre los testigos y sus tratamientos correspondientes.

Gráfica 4: Distribución de clones / individuos del testigo agua y tratamientos (MMS 0.125, MMS 0.250 y MMS 0.375 mM) en la CE. Los tamaños de los clones indican los eventos de división celular de los discos imaginales de las alas de *D. melanogaster* [1(1), 2(2), 3(3-4), 4(5-8), 5(9-16), 6(17-32) y 7(>33) células].

En la Tabla 3 inciso A y Gráfica 5 se muestra la comparación del tratamiento Vit C-FeSO₄ y los co-tratamientos MMS con Vit C-FeSO₄. Se observa un incremento en manchas pequeñas y totales para el tratamiento MMS 0.125 mM-Vit C-FeSO₄ y en manchas pequeñas, grandes y totales para el tratamiento MMS 0.375 mM-Vit C-FeSO₄.



★ Diferencias estadísticamente significativas.

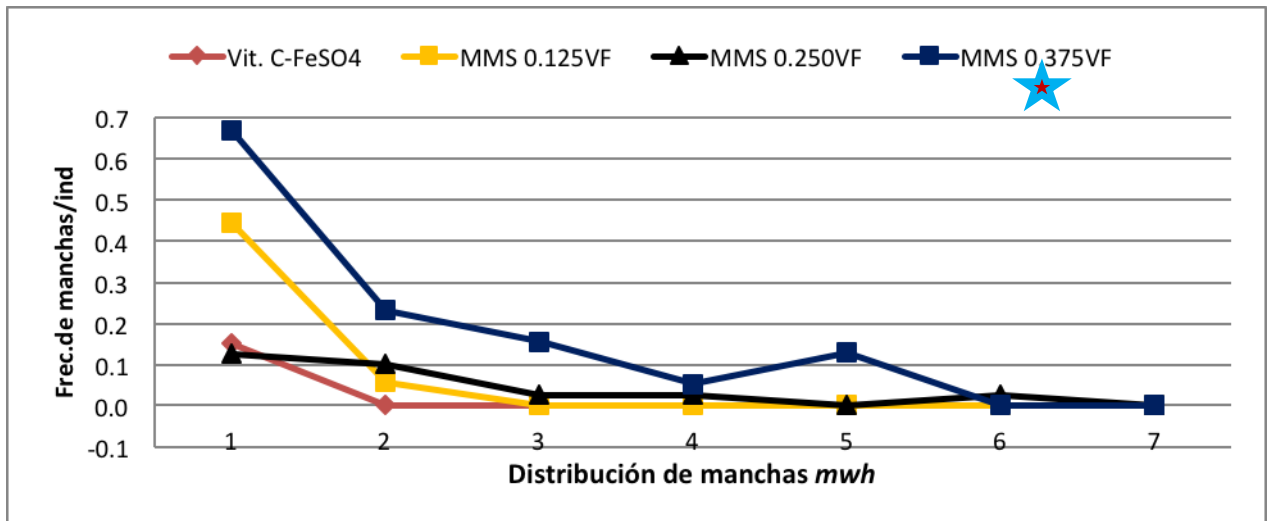
Gráfica 5: Frecuencia de manchas / individuos del testigo Vit C-FeSO₄ y tratamientos (MMS 0.125 - Vit C- FeSO₄, MMS 0.250 - Vit C- FeSO₄ y MMS 0.375 - Vit C- FeSO₄) en la CE.

Tabla 3. Continuación de resultados de la prueba SMART en ala de *D. melanogaster* para la progenie heterocigota (*Serratia*) de la cruce CE, después del tratamiento crónico a larvas (72±4 h) con Vitamina C (Vit C) Sulfato Ferroso (FeSO₄) y Metil metanosulfonato (MMS).

Tratamiento (Concentración mM)	Número de moscas	Manchas por individuo (número de manchas) análisis estadístico*								
		Manchas pequeñas (1-2 células) m=2			Manchas grandes (> 2 células) m=5			Manchas totales m=2		
Cruza Estándar (CE)										
A.										
Vit C (5.6)+ FeSO ₄ (0.2)	60	0.15	(9)		0.00	(0)		0.15	(9)	
MMS 0.125+ Vit C (5.6)+ FeSO ₄ (0.2)	18	0.44	(8)	+	0.06	(1)	i,ns	0.50	(9)	+
MMS 0.250+ Vit C (5.6)+ FeSO ₄ (0.2)	40	0.22	(9)	-	0.08	(3)	-	0.30	(12)	-
MMS 0.375+ Vit C (5.6)+ FeSO ₄ (0.2)	39	0.90	(35)	+	0.33	(13)	+	1.23	(48)	+
B.										
MMS 0.125	19	0.16	(3)		0.05	(1)		0.21	(4)	
MMS 0.125+ Vit C (5.6)+ FeSO ₄ (0.2)	18	0.44	(8)	+	0.06	(1)	-	0.50	(9)	-
C.										
MMS 0.250	20	0.50	(10)		0.20	(4)		0.70	(14)	
MMS 0.250+ Vit C (5.6)+ FeSO ₄ (0.2)	40	0.22	(9)	↓	0.08	(3)	-	0.30	(12)	↓
D.										
MMS 0.375	40	0.62	(25)		0.47	(19)		1.10	1.10	
MMS 0.375+ Vit C (5.6)+ FeSO ₄ (0.2)	39	0.90	(35)	i,ns	0.33	(13)	-	1.23	1.23	-

* Diagnóstico estadístico de Frei and Würzler (1988), m = factor de multiplicación del riesgo mínimo para evaluar resultados negativos. Resultados: -, negativo; +, positivo; i, indeciso, ↓ reducción significativa ($p < 0.05$) y Prueba de U de Mann-Whitney y Wilcoxon, donde **ns**= no significativo con $p \leq 0.05$.

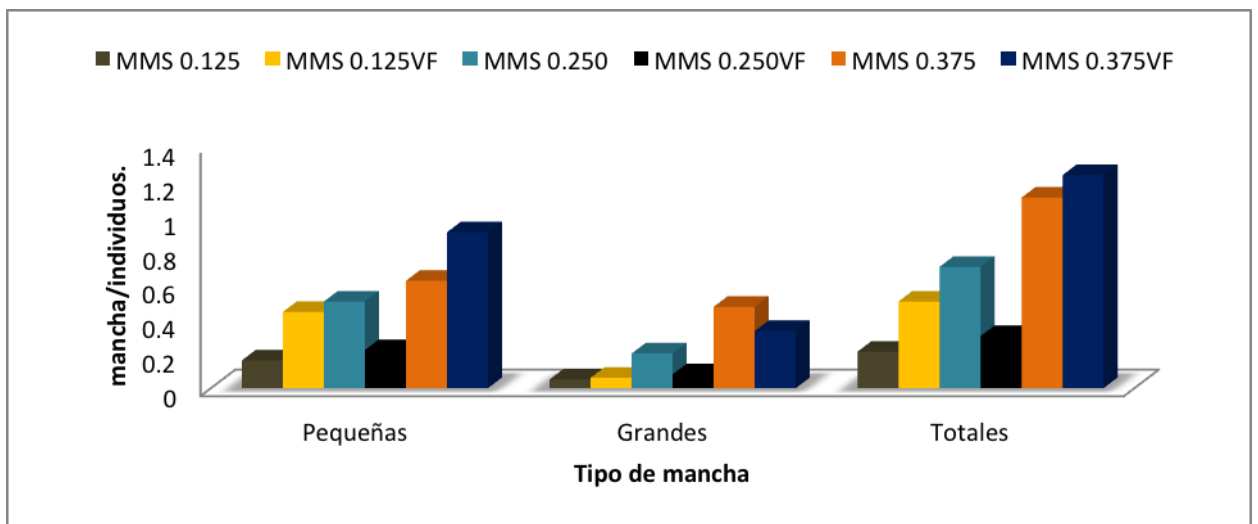
En la Gráfica 6 el análisis de distribución de clones *mwh* mostró diferencias estadísticamente significativas sólo en la comparación del testigo Vit C-FeSO₄ contra MMS 375 mM-Vit C-FeSO₄.



★ Diferencias estadísticamente significativas entre los testigos y sus tratamientos correspondientes.

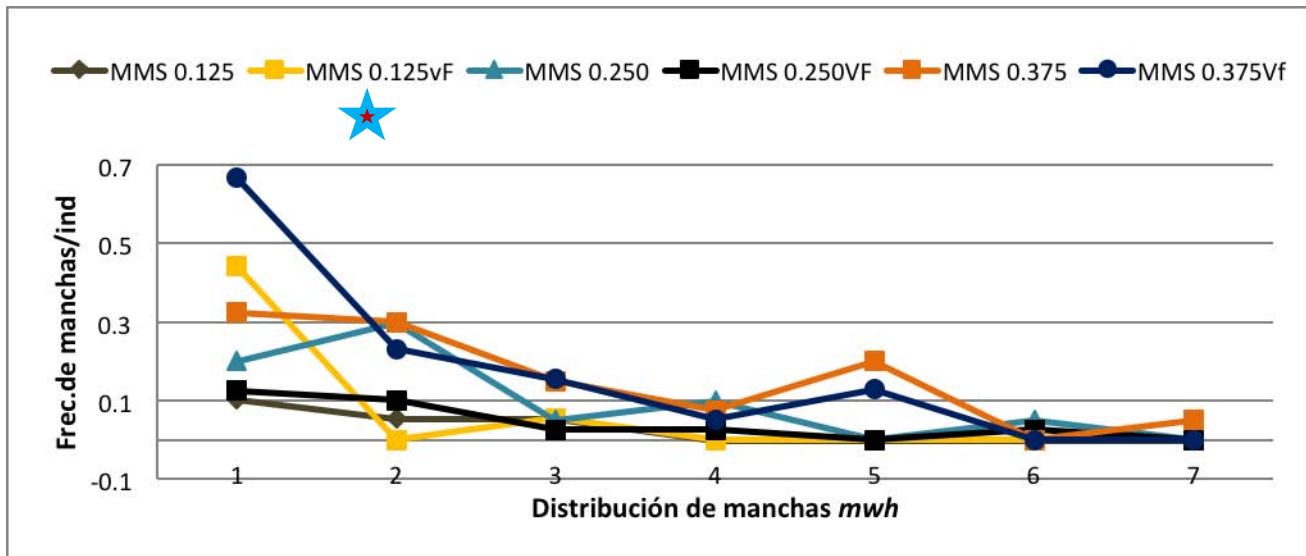
Gráfica 6: Distribución de clones/ individuos del testigo Vit C- FeSO₄ y tratamientos (MMS 0.125 - Vit C- FeSO₄, MMS 0.250 - Vit C- FeSO₄ y MMS 0.375 - Vit C- FeSO₄) en la CE. Los tamaños de los clones indican los eventos de división celular de los discos imaginales de las alas de *D. melanogaster* [1(1), 2(2), 3(3-4), 4(5-8), 5(9-16), 6(17-32) y 7(>33) células].

En la Tabla 3 incisos B, C y D y Gráfica 7 se muestran los resultados de la comparación del testigo positivo MMS 0.125 mM contra el co-tratamiento MMS 0.125 mM-Vit C-FeSO₄, el testigo positivo MMS 0.250 mM contra el co-tratamiento MMS 0.250 mM-Vit C-FeSO₄, y el testigo positivo MMS 0.375 mM contra el co-tratamiento MMS 0.375 mM-Vit C-FeSO₄, respectivamente. Los resultados indican que no hubo diferencias estadísticamente significativas para ninguna comparación y en ningún tipo de mancha.



Gráfica 7: Frecuencia de manchas / individuos de los testigos (MMS 0.125, MMS 0.250 y MMS 0.375) y tratamientos (MMS 0.125 - Vit C- FeSO₄, MMS 0.250 - Vit C- FeSO₄ y MMS 0.375 - Vit C- FeSO₄) en la CE.

En la Gráfica 8 el análisis de distribución de clones *mwh* mostró diferencias estadísticamente significativas sólo en la comparación del testigo positivo MMS 0.125 mM y el co-tratamiento MMS 0.125 mM-Vit C-FeSO₄.



★ Diferencias estadísticamente significativas entre los testigos y sus tratamientos correspondientes.

Gráfica 8: Distribución de clones/ individuos de los testigos (MMS 0.125, MMS 0.250 y MMS 0.375 mM) y tratamientos (MMS 0.125 - Vit C- FeSO₄, MMS 0.250 - Vit C- FeSO₄ y MMS 0.375 - Vit C- FeSO₄) en la CE. Los tamaños de los clones indican los eventos de división celular de los discos imaginales de las alas de *D. melanogaster* [1(1), 2(2), 3(3-4), 4(5-8), 5(9-16), 6(17-32) y 7(>33) células].

DISCUSIÓN

Cruza Estándar (CE)

Los resultados de este trabajo indicaron que el tratamiento Vitamina C (5.6 mM) no incrementó la frecuencia espontánea de manchas presentada en el testigo agua. Esto concuerda con Kaya y colaboradores (2002) que reportaron que la vitamina C (25, 75 y 250 mM) no fue genotóxica en la CE de la prueba SMART en ala de *D. melanogaster*. En el presente trabajo se hizo de manera complementaria la prueba de Kolmogorov - Smirnov para comparar la distribución de clones, indicando que la Vitamina C alteró la división celular presentada con el agua. En su trabajo, Kaya propuso que a pesar de que no se encontraron efectos genotóxicos de la Vitamina C, bajo ciertas condiciones puede llegar a ocasionar clastogenicidad debido al potencial aumento de la producción de H₂O₂ y radicales hidroxilo ([•]OH) y a través de la reacción de Fenton, y que si este efecto no se reflejó en un incremento de la frecuencia de manchas pudo ser debido a los sistemas de reparación encontrados al trabajar con un modelo *in vivo*. Esto último puede explicar la discrepancia con los resultados de Franke et al. (2005) quienes sí encontraron genotoxicidad de la Vitamina C a concentraciones bajas (0.01 y 0.17 mM) en el ensayo cometa en células de ratón, *in vitro*.

Tratamiento FeSO₄.

El tratamiento FeSO₄ (0.2 mM) mostró un incremento estadísticamente significativo sólo en manchas totales con respecto al agua, y alteró la división celular, esto pudo ser debido a que el Hierro (II) puede producir radicales $\cdot\text{OH}$ y superóxido ($\text{O}_2\cdot^-$) por la reacción de Fenton, estos radicales atacan las agrupaciones [4Fe-4S] y éstas a su vez reaccionan rápidamente con moléculas cercanas (Franke *et al.*, 2005). Por lo tanto, el estrés oxidante pudo ser la principal causa del daño por FeSO₄ (Freitas y Meneghini, 2001).

Co-tratamiento Vitamina C-FeSO₄.

Por otra parte, la Vitamina C (5.6 mM) en co-tratamiento con el FeSO₄ (0.2 mM) no mostraron diferencias estadísticamente significativas en las frecuencias de manchas con respecto al agua y sólo se mostró alteración de la división celular. El no encontrar efectos genotóxicos en esta interacción puede estar relacionado con la capacidad antioxidante de la Vitamina C. Suh *et al.* (2003) demostraron que la Vitamina C (25, 50 y 75 μM) en co-tratamiento con metales de transición como el Hierro (50 μM) reduce el daño oxidativo generado por el hierro, mediante la conversión del ion férrico a iones ferrosos, que a su vez pudieron eliminar los radicales libres y evitar el inicio de la peroxidación lipídica.

Tratamientos MMS.

Se observó un incremento estadísticamente significativo en la frecuencia de manchas en los tratamientos MMS (0.250 y 0.375 mM) en manchas pequeñas, grandes y totales con respecto al agua, y alteración de la división celular; esto era de esperarse ya que el MMS es un agente alquilante que puede formar N-alquilaciones de DNA, seguido por la formación de sitiosapurínicos (AP), lo que puede dar origen a rompimientos de cadena simples o dobles del DNA (Bilbao, 2002). En este trabajo se comprueba la actividad genotóxica del MMS, ya que Rodríguez-Arnáiz (1996) y Heres-Pulido (2001) confirmaron la genotoxicidad del MMS (2.0 y 1.2 mM), respectivamente, en la prueba SMART en ala de *D. melanogaster*. Por otro lado, Calléja (1999) reportó efecto mutagénico del MMS (0.5 y 0.75 mM) en células de ovario de Hámster Chino.

Co-tratamientos MMS-Vit C-FeSO₄.

Se observó un incremento estadísticamente significativo en la frecuencia de manchas pequeñas y totales para el tratamiento MMS 0.125 mM-Vit C-FeSO₄ e incrementó en manchas pequeñas, grandes y totales para el tratamiento MMS 0.375 mM-Vit C-FeSO₄ con respecto al testigo Vit C-FeSO₄. Esto era de esperarse en primera instancia por la presencia del MMS que como ya se ha dicho es un agente genotóxico que provoca daños en el DNA (Monti *et al.*, 2014) y por eso se utilizó como testigo positivo. El que no se encontraran diferencias significativas en el tratamiento MMS 0.250 mM - Vit C - FeSO₄ hace ver un posible efecto antimutagénico

de la combinación Vitamina C - FeSO₄, pero el que sólo se encontrara a esta concentración indica que este efecto es variable y depende de la concentración de MMS que se emplee. Una posible explicación del efecto mutagénico en dos concentraciones y antimutagénico en una, podría indicar una modulación entre el efecto pro-oxidante de la vitamina C (Yan *et al.*, 2014) y la inducción de los sistemas de reparación (Franke *et al.* 2005).

Comparando MMS 0.125, 0.250 y MMS 0.375 mM contra sus respectivos co-tratamientos con Vit C - FeSO₄ se encontró:

1) incremento estadísticamente significativo en manchas pequeñas para MMS 0.125 mM - Vit C - FeSO₄. Se había mencionado que no se encontraron efectos mutagénicos en los testigos MMS 0.125 mM, Vitamina C, FeSO₄ o Vitamina C-FeSO₄ por separado, pero su interacción muestra mutagenicidad, esto puede deberse a un efecto sumativo de todos los factores involucrados en esta interacción, ya que por un lado el MMS es un agente alquilante que puede formar rompimientos de cadena simples o dobles del DNA (Bilbao *et al.* 2002). Por su parte la Vitamina C ha sido reportada por Yan *et al.* (2014) como un compuesto que a la concentración 2 mM puede actuar como pro-oxidante mediante la generación de ROS, que en última instancia llevan a procesos de apoptosis, necrosis, inactivación del ciclo celular y vías de señalización. Aunado a esto, Franke *et al.* (2005) reportaron daños en el DNA por metales de transición como el FeSO₄ ya que pueden romper directamente las cadenas de DNA o participar en las reacciones de estrés oxidante; también mencionan que en co-tratamiento con Vitamina C se incrementa el daño producido por el FeSO₄ y que el aumento del daño depende de la concentración de Vitamina C que se use.

2) Reducción significativa de manchas pequeñas y totales para MMS 0.250 mM - Vitamina C - FeSO₄. Estos resultados pueden explicarse debido a que como se mencionó antes la interacción Vitamina C - FeSO₄ en algunas condiciones y concentraciones puede llegar a tener un efecto pro-oxidante, lo que genera estrés oxidante y por resultado final rompimiento de cadenas de DNA, lo que según Franke et al. (2005) puede dar como consecuencia la estimulación de la reparación del DNA, por lo que se considera a la Vitamina C como un buen estimulante de los sistemas de reparación y este es un punto muy importante que se debe tomar en cuenta al trabajar con modelos *in vivo* (Kaya et al., 2002). Otra posible explicación sería que la Vitamina C o alguno de sus metabolitos creara enlaces con el mutágeno y evitara así que éste se uniera a sitios nucleofílicos, tales como los del DNA (Kaya, 2003). La reducción de la mutagenicidad mostrada en el co-tratamiento MMS 0.250 mM - Vitamina C - FeSO₄ del presente trabajo concuerdan con trabajos previos en el Laboratorio de Genética Toxicológica (LGT) donde Arista (2008) y Estrada (2008) encontraron que los tratamientos Vitamina C - FeSO₄ redujeron la genotoxicidad del MMS en *D. melanogaster* en moscas transheterocigotas donde se evaluó mutación y recombinación.

3) No se encontraron diferencias significativas en ningún tipo de mancha para MMS 0.375 mM - Vit C - FeSO₄ y tampoco alteración de la división celular. Esto puede indicar que aunque la Vitamina C puede actuar como un buen promotor de los sistemas de reparación (Franke et al., 2005) o pueda tener la capacidad de bloquear la unión covalente del MMS con el DNA (Kaya, 2003) a concentraciones mayores de MMS la cantidad de Vitamina C ya no es suficiente para visualizarlo en una reducción significativa de manchas.

CONCLUSIONES

- ❖ Los tratamientos Vit C, FeSO₄ y Vit C - FeSO₄ solos únicamente mostraron alteración de la división celular, posiblemente por reacciones de estrés oxidativo.
- ❖ El efecto mutagénico del MMS fue proporcional a la concentración utilizada.
- ❖ La interacción de MMS 0.125 - Vit C - FESO₄ mostró mayor efecto mutagénico debido al efecto sumativo de los factores involucrados en esta interacción.
- ❖ La interacción de MMS 0.250 – Vit C- FeSO₄ mostró efecto antimutagénico secundario posiblemente debido a que la propiedad pro-oxidante de la vitamina C también estimula la reparación del DNA.
- ❖ La interacción MMS 0.375 – Vit C – FeSO₄ no mostró aumento en la mutagenicidad posiblemente por la modulación entre la mutagenicidad del MMS y la inducción de sistema de reparación o por un bloqueo de la unión covalente del MMS al DNA, por parte de la vitamina C.

RECOMENDACIONES

- ❖ Realizar estudios a concentraciones más bajas de MMS.
- ❖ Realizar estudios a concentraciones bajas de Vit C, FeSO₄ Vit C -FeSO₄ para evaluar la interacción con el MMS.

REFERENCIAS

Arista, D. D. M. (2008). Evaluación de la interacción del MMS, FeSO₄ y vitamina C con la prueba SMART en ala de *Drosophila melanogaster*. Tesis de licenciatura. FES Iztacala, UNAM. 28 pág.

Bacon, B. R. and R. S. Briton. (1990). The pathology of hepatic iron overload: a free radical-mediated process? *Hepatology*. **11**: 127-131.

Boiteux, S., O. Huisman, and J. Laval. (1984). 3-Methyladenine residues in DNA induce the SOS function *sfia* in *Escherichia coli*. *EMBO J.* **3**: 2569-2573.

Calléja, F., J. G. Jansen, H. Vrieling, F. Laval, and A.A van Zeeland. (1999). Modulation of the toxic and mutagenic effects induced by methyl methanesulfonate in Chinese hamster ovary cells by overexpression of the rat *N*-alkylpurine-DNA glycosylase. *Mutat. Res.* **425**: 185-194.

Castañeda, P. L., P. M. E. Heres y G. I. E. Dueñas. (2008). *Drosophila melanogaster* un modelo experimental. FES Iztacala, UNAM. 86 pag.

De Freitas, J. M., and R. Meneghini. (2001). Iron and its sensitive balance in the cell. *Mutat. Res.* **475** (1-2): 153-159.

Dueñas, G. I. E., P. M. E. Heres., L. Castañeda and U. Graf. (2001). Easy raising of *Drosophila melanogaster* on a medium consisting of mashed potato flakes and a preservative solution. *D. I. S.* **84**: 166.

Estrada, G. K. P. (2008). Evaluación de la interacción de vitamina C, ion fierro y diferentes concentraciones de metil metanosulfonato (MMS) con la prueba SMART en ala de *Drosophila melanogaster*. Tesis de licenciatura. FES Iztacala, UNAM. 61 pag.

Forrellat, B. M., G. H. Gautier du Défaixy and D. N. Fernández. (2000). Metabolismo de Hierro. *Rev. Cubana. Hematol. Inmunol. Hemoter.* **16** (3): 149-60.

Fraga, C. G., and P. I. Oteiza. (2002). Iron toxicity and antioxidant nutrients. *Toxicology.* **180**: 23-32.

Franke, S.I., D. Prá, J. Da Silva, B. Erdtmann and J.A. Henriques. (2005). Possible repair action of Vitamin C on DNA damage induced by methyl methanesulfonate, cyclophosphamide, FeSO₄ and CuSO₄ in mouse blood cells *in vivo*. *Mutat. Res.* **1**: 75-84.

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

Friedberg, E. C., G. C. Walter and W. Slede. (1995). DNA Repair and mutagenesis. ASmpress. Washintong D. C. 698 pp.

Graf, U., F. E. Würgler, A. J. Katz, H. Frei, H. Juon, C. B. Hall and P. G. Kale. (1984). Somatic Mutation and Recombination Test in *Drosophila melanogaster*. *Environ. Mutagen.* **6**: 153-188.

Graf, U., A. A. Moraga, R. Castro, and C. E. Diaz. (1994). Genotoxicity testing of different types of beverages in the *Drosophila* wing somatic mutation and recombination test. *Food. Chem. Toxicol.* **32**: 423–430.

Graf, U., M. A. Spanó, J. Guzmán Rincón, S. K. Abraham and H. H. Andrade. (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. *Afr. Newslett on Occup Health and Safety.* **6**: 9-13.

Guzmán, R. J. and U. Graf. (1995). *Drosophila melanogaster* Somatic Mutation and Recombination Test as a biomonitor. In: Biomonitoring and biomarkers as indicators of environmental change. *Envir. Sci. R.* **50**: 169-181.

Heres-Pulido, M. E I. (2001). Efecto de los nitratos de plomo y de calcio sobre la acción mutagénica y recombinogénica del metilmetanosulfonato en *Drosophila melanogaster*. Tesis de maestría. Facultad de Ciencias, UNAM. 157 pag.

James, H. S., K. J. Lu Ann and R. H. Janet. (2007). Nutrient physiology, metabolism and nutrient interaction electrolytic iron in women with moderate to low iron stores. *J. Nutr.* **137**: 620-627.

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

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

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

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

Monti, P., G. Foggetti, P. Menichini, A. Inga, B. Gold and G. Fronza. (2014). Comparison of the biological effects of MMS and Me-lex, a minor groove methylating agent: Clarifying the role of N3-methyladine. *Mutat. Res.* **759**: 45-51.

Ramos, P., H. M. Abundis, J. C. Gaytan, M. G. Ordaz, P. G. Orozco, J. Maldonado, J. Hernández, E. Gonzales, P. Reyes, E. M. Galicia, and J.A. Muñoz. (1993). Manual de laboratorio de genética para *Drosophila melanogaster*. Edit. McGraw-Hill, México. 131 pag.

Rodríguez-Arnáiz, R. (1994). Las toxinas ambientales y sus efectos genéticos. Ed. La ciencia para todos. 4ª Ed. México, D.F. 11pág.

Rodríguez-Arnáiz, R., P. O. Soto, J. C. G. Oyarzún, and U. Graf. (1996). Analysis of mitotic recombination induced by several mono and bifunctional alkylating agents in the *Drosophila* wing-spot test. *Mutat. Res.* **351**: 133-145.

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.

Sayin, V. L., M. X. Ibrahim, E. Larsson, J. A. Nilsson, P. Lindahl and M. O. Bergo. (2014). Antioxidants accelerate lung cancer progression in mice. *Sci. Transl. Med.* **6** (221): 221ra-15.

Shils, M. E., J. A. Olson, M. Shikey A. C. Ross. (2002). Nutrición en salud y enfermedad. Edit. Mc-graw Hill-interamericana, 9ª ed. Vol. 1. México. 541-542.

Sobol, Z., M.E. Engel, E. Rubitski, W.W. Ku, J. Aubrecht, and R.H. Schiestl. (2007). Genotoxicity profiles of common alkyl halides and esters with alkylating activity. *Mutat. Res.* **633**: 80-94.

Spanó, M. A., y U. Graf. (1998). Segundo taller sobre SMART: Un método para detectar las actividades mutagénicas y recombinogénicas en células somáticas de *Drosophila* en la Universidad Federal de Uberlandia (MG) Brasil. *Rev. Int. Contam. Ambien.* **14**: 111-114.

Suh, J., B. Z. Zhu, and B. Frei. (2003). Ascorbate does not act as a pro-oxidant towards lipids and proteins in human plasma exposed to redox-active transition metal ions and hydrogen peroxide. *Free Radic. Biol. Med.* **34** (10): 1306-1314.

Vega, C. V. (2005). Evaluación de la interacción del brócoli (*Brassica oleracea var. italica*) con el MetilMetanosulfonato (MMS) en la prueba de mutación y recombinación somática (SMART) en ala de *Drosophila melanogaster* (Cruza E y BE). Tesis de licenciatura. FES Iztacala, UNAM. 62 pag.

Vogel, E. W., A. Barbin, M. J. M. Nivard and H. Bartsch. (1990). Nucleophilic selectivity of alkylating agents and their hypermutability in *Drosophila* as predictors of carcinogenic potency in rodents. *Carcinogenesis.* **11**: 2211-2217.

Yan, M., J. Chapman, M. Levine, K. Polireddy, J. Drisko, and Q. Chen (2014). High-dose parenteral ascorbate enhanced chemosensitivity of ovarian cancer and reduced toxicity of chemotherapy. *Sci. Transl. Med.* **6** (222): 222ra18.

ANEXO 1

Ciclo de vida de *Drosophila melanogaster*

Drosophila melanogaster tiene 4 fases: Huevo (0.5 mm), Larva (4-5 mm), Pupa (3 mm) y Adulto (2 mm). El desarrollo completo de la mosca se da en un tiempo aproximado de nueve días en condiciones ambientales óptimas. El desarrollo embrionario se produce dentro del huevo, originándose una larva que pasa por tres estadios, durante la fase de pupa se produce la metamorfosis, en la que se forman las estructuras externas del adulto (imago), a partir de estructuras denominadas "discos imaginales". Finalizando la metamorfosis, emerge el adulto. Pasadas 8 h. tras la eclosión de la pupa, las hembras adultas pueden ser fecundadas (Castañeda *et al.*, 2008).

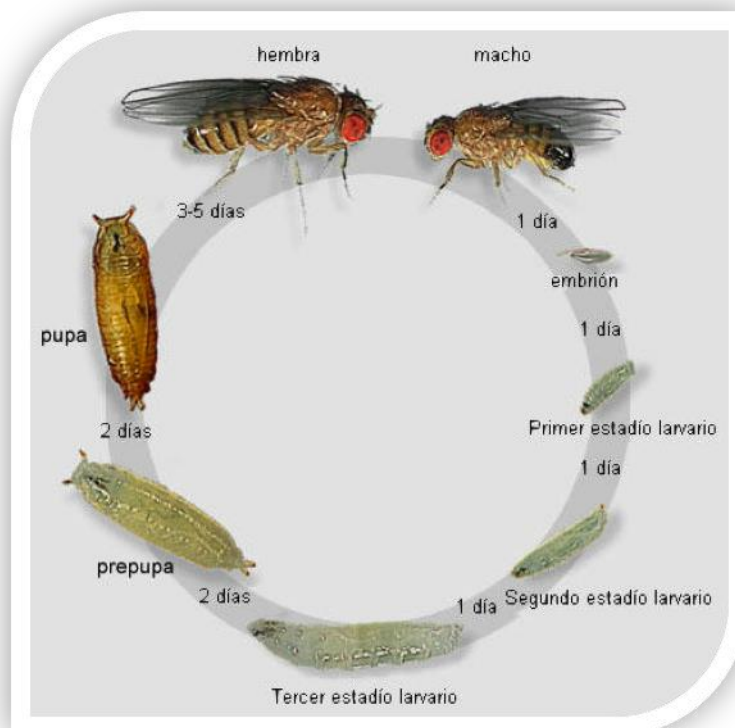


Fig 4: Ciclo de vida de *D. melanogaster*

ANEXO 2

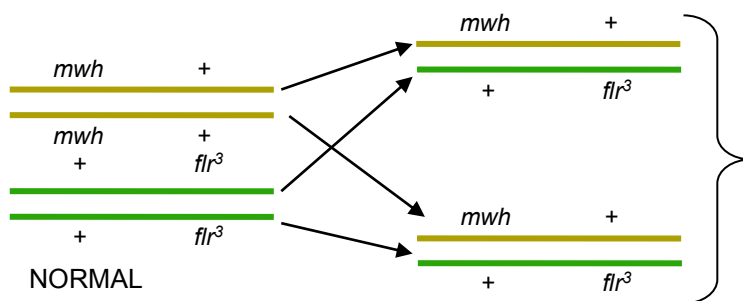
Eventos genéticos en moscas heterocigotas (alas serratia)

1 Célula en G₂

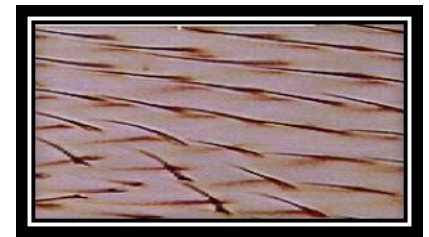
Mitosis

2 Células en G₁

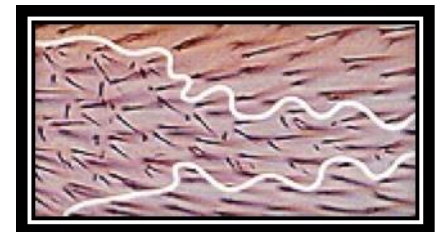
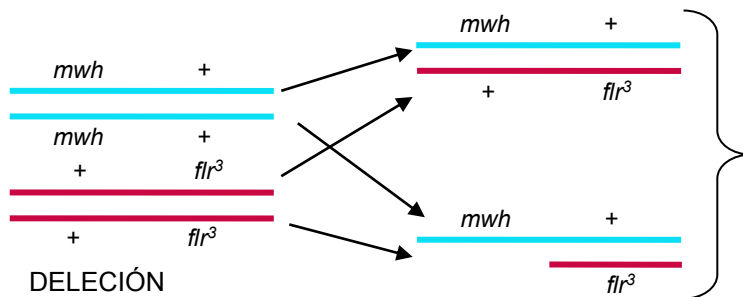
Eventos genéticos que ocasionan la pérdida de heterocigosis en progenie Serratia, para los marcadores *flr³* y *mwh*, y la formación de manchas en SMART en ala.



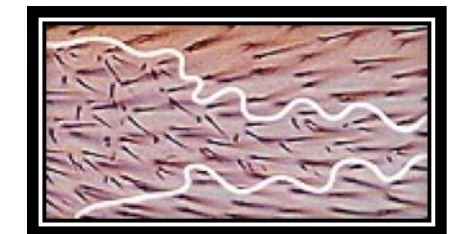
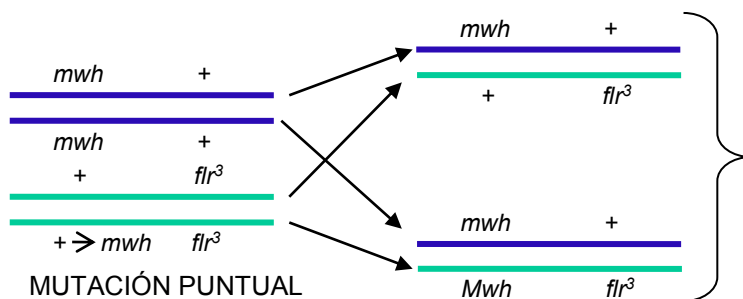
Clones resultantes



Normales



Clon *mwh* grande



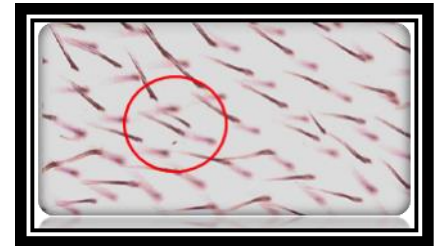
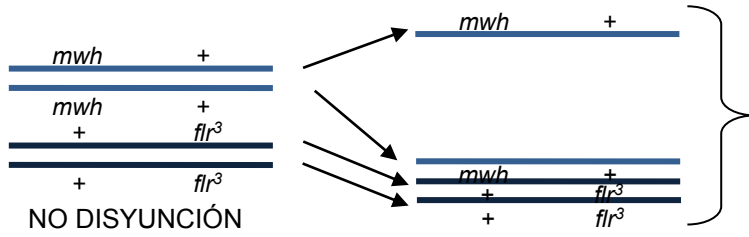
Clon *mwh* grande

1 Célula
en G₂

Mitosis

2 Células
en G₁

Clones resultantes



Clon *mwh* pequeña

ANEXO 3

Solución conservadora

Materiales:

- ❖ 5 mL de una solución de ácido propiónico: ortofosfórico (10:1) como bactericida.
- ❖ 5 mL de Nipagin (Tegosept) al 12% como fungistático (12 g aforados a 100 ml de solución con alcohol al 96%).

Para preparar la solución conservadora se debe diluir la solución de ácidos en un poco de agua y agitar; añadir el Nipagin y agitar, finalmente aforar a 1 L con agua corriente y conservar en un envase color ambar (Figura 4).

Para preparar el medio de cultivo se pesan 5 g de hojuela de papa para un frasco cremero esterilizado y se le agregan 20 mL de solución conservadora, se deja secar y se transvasan las moscas (Castañeda *et. al.*, 2008).



Figura 5: Solución conservadora.

ANEXO 4

Sexado de D. melanogaster

- ❖ Seleccionar frascos con pupas, retirarles las moscas adultas y meterlos a incubar a 25° C por un tiempo de 4 h.
- ❖ Consecutivamente revisar los frascos, trasvasar a un frasco vacío, las moscas que emergieron y dormir las con CO₂.
- ❖ Separar las hembras con ayuda de un microscopio estereoscópico, distinguiéndolas por tres características (Figura 5):
 - Tamaño (la hembra es más grande que el macho).
 - Los machos tienen fusionados y melanizados los últimos tres segmentos abdominales.
 - Los machos en el primer par de patas tienen peine sexual (grupo de 10 cerdas).
- ❖ Para confirmar que las moscas son vírgenes hay que colocarlas en tubos de ensayo con 0.5 g de puré de papa y 2 mL de solución conservadora durante un periodo de 72 h (si en este tiempo no hay larvas se procede a realizar la cruce).

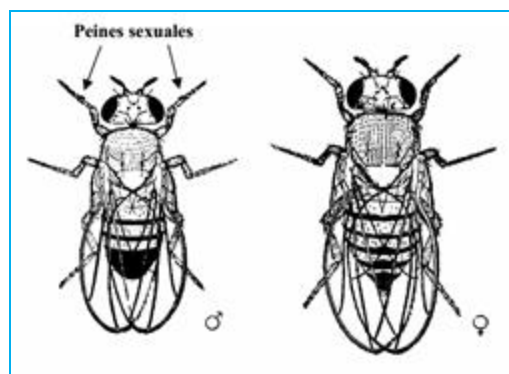


Figura 6: Dimorfismo sexual en *D. melanogaster*.

ANEXO 5

Preparación de medio de levadura activada

- ❖ Desmoronar la levadura, agregar una cucharada de azúcar y agua para activarla y mezclarla.
- ❖ Poner la mezcla a Baño María a 38-40°C por 5 min, posteriormente retirarla y seguir mezclando a temperatura ambiente por otros 5 min. Repitiendo tres veces.
- ❖ La levadura se vacía a los frascos cremeros estériles y éstos se cubren con una gasa para dejarlos reposar por 24 h.



Figura 7: Levadura activa.