

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO.



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA.

**“EVALUACIÓN DE LA POSIBLE ACTIVIDAD MODULATORIA DEL
RESVERATROL HACIA EL MMS, CON SMART EN ALA DE
Drosophila melanogaster CRUZA BIOACTIVACIÓN ELEVADA.”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

B I Ó L O G O

P R E S E N T A:

JOSÉ MANUEL SÁNCHEZ LÓPEZ

DIRECTORA DE TESIS:

M. en C. María Eugenia Isabel Heres y Pulido

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.

**Y esto es para mí el conocimiento: que
todos asciendan a mi nivel.**

Friedrich Nietzsche

DIDICATORIA

Con toda sinceridad, cariño, respeto y gratitud, dedico este trabajo **a mi padre**, por haberme brindado todo el apoyo, confianza, libertad y amor que de un padre pueda emanar para su hijo, por mostrarse como un ejemplo en mi vida y motivarme a seguir en cualquier adversidad que se me presentara, por no rendirse jamás, por seguir aquí a pesar de que las circunstancias de la vida no favorecieran y demostrar una larga lucha de esfuerzos ante tiempos oscuros sin perder la esperanza en nada, porque sé, que a pesar de todo, siempre dio lo mejor de sí tratando de enfocar mi mente hacia la más alta llanura de este universo, por creer en mí y por enseñarme a vivir. Hoy a través de este, el primero y más importante de mis logros propuestos, quiero que sepas que tus enseñanzas tuvieron éxito, que te admiro y te amo, a ti padre te dedico este trabajo en el que he entregado una parte de mi vida y he impregnado fragmentos de mi alma, como muestra de lo eternamente agradecido que siempre estaré contigo.

AGRADECIMIENTOS

A **mi madre**, con especial agradecimiento hacia ti, porque siempre me guiaste con tu enorme cariño y fuiste el principal pilar de apoyo en mi vida, porque siempre estuviste ahí cuando más lo necesite en momentos buenos y malos, por el simple hecho de traerme al mundo y continuar luchando sin doblegarte nunca, eres el ser más maravilloso que existe en mi vida y por este agradecimiento se lo comparto a todo el universo, mi madre es la mejor y gracias a ella lo logre.

A **mi hermana Elizabeth**, gracias por siempre brindarme tu apoyo sincero y la más grande confianza, por motivarme, aconsejarme y no dejarme caer, con tu gran personalidad lograste que este éxito se hiciera realidad, gracias por todo hermana.

A **mis hermanas Gloria, Frida y Diana**, gracias por estar presentes en todo momento de mi vida, por hacerme reír, por mostrarme lo amena que es la vida, ya que sin su cariño, apoyo y consejo no habría logrado esto, gracias las amo.

A **mi hermano y amigo Mario (FLOSAN)**, tu que estas y siempre estarás en todos los momentos que pueda vivir, eres el ser, que único, conoce todo de mí y por ello comparto todo contigo, mi gran amigo adorado, gracias por tu hermandad sincera, por complementar toda mi vida y por brindarme el más puro y honesto cariño que pueda existir, gracias porque nada en mi tiene sentido sin ti.

A **mis abuelos Vicente y Clemen** quienes desde que tengo uso de memoria siempre han estado con nosotros bajo cualquier circunstancia, apoyándonos, dando cariño y llenando de alegría nuestras vidas, sin duda les agradezco por ser el sostén de unión de mi familia ya que sin eso jamás lo habría logrado.

A **mis amigos de carrera, Lalo, Chucho, Erika y Bibi**, gracias por compartir los mejores momentos de estudio conmigo, por hacer más amena la escuela y apoyarme en todo momento, ustedes son testigos del gran esfuerzo que de este éxito costo, les agradezco su amistad sincera y siempre les deseare lo mejor.

A **mi amigo Armando**, gracias por mostrarte sincero, por tu gran personalidad, por escucharme y por tus consejos, por prestarme tus apuntes y apoyarme, sin duda eres único, te agradezco por formar parte de esto.

A **mi maestra, consejera y amiga Maru**, porque siempre me apoyo, creyó en mí y demostrando al más grande profesionalismo, me tuvo paciencia, me guio en todo este proceso profesional y en grandes aspectos de mi vida, es usted una persona maravillosa gracias por no rendirse conmigo y permitirme culminar con mi trabajo, la admiro, le respeto y la quiero, mil gracias maestra.

A **los profesores Luis e Irma**, por que hicieron de mi estancia en el laboratorio la más grande de mis experiencias profesionales, por enseñarme nuevas cosas, por compartir su sabiduría y darme ese cobijo, por brindarme su confianza y consejo, gracias a ustedes esto es una realidad.

CONTENIDO

Contenido	- 6 -
Índice de figuras	- 8 -
Lista de abreviaturas	- 10 -
Resumen.....	- 11 -
Abstract.....	- 12 -
Introducción.....	- 13 -
Resveratrol.....	- 14 -
Actividad del RES.....	- 16 -
Agentes alquilantes.....	- 18 -
Metil metanosulfonato.....	- 18 -
Citocromos P450.....	- 20 -
SMART en ala y citocromos P450 de <i>Drosophila melanogaster</i>	- 21 -
Antecedentes.....	- 22 -
Justificación.....	- 24 -
Hipótesis.....	- 25 -
Objetivo general.....	- 25 -
Objetivos particulares.....	- 25 -
Materiales y métodos.....	- 26 -
Químicos.....	- 26 -
SMART en ala.....	- 26 -
Resultados y discusión.....	- 30 -
Controles MMS/EtOH y MMS/Agua.....	- 31 -

Testigos resveratrol.....	- 33 -
Tratamientos RES/MMS.....	- 35 -
Conclusiones.....	- 38 -
Referencias.....	- 39 -
Anexo 1.....	- 48 -
Anexo 2.....	- 50 -

ÍNDICE DE FIGURAS.

Figura 1 Estructuras químicas del resveratrol, de sus formas trans y cis.....	- 15 -
Figura 2 Oxidación del RES catalizada por los CYP450s. Conversión del trans-resveratrol a picetanol en presencia de NADPH.....	- 17 -
Figura 3 Potenciales sitios de metilación del DNA, asociados a la toxicidad y mutagénesis de los agentes alquilantes.....	- 19 -
Figura 4 Estructura química del metil metanosulfonato.....	- 19 -
Tabla I Muestra los sitios de metilación por varios agentes alquilantes dentro de ellos el MMS.....	- 20 -
Tabla II Tratamientos administrados a las larvas de tercer estadio para evaluar la actividad de RES/MMS con SMART.....	- 27 -
Tabla III Resumen de los resultados obtenidos con SMART.....	- 30 -
Figura 5 Efecto del MMS 0.5 mM, disuelto en EtOH 1% y agua, en la frecuencia de todos los tipos de manchas mwh/individuo.....	- 32 -
Figura 6 Frecuencia de manchas por individuo por cada tamaño de clon mwh.....	- 32 -
Figura 7 Efectos del RES en la frecuencia de todos los tipos de manchas mwh/individuo.....	- 34 -
Figura 8 Distribución de la frecuencia de manchas por individuo por cada tamaño de clon mwh obtenidas después del análisis SMART para los tratamientos con RES (2.5, 10 y 40 µg/mL) comparados con EtOH 1%.....	- 34 -
Figura. 9 Efectos del RES/MMS en la frecuencia de todos los tipos de manchas mwh/individuo.....	- 37 -
Figura 10 Frecuencia de manchas por individuo por cada tamaño de clon mwh obtenidas después del análisis SMART para los tratamientos con RES (2.5, 10 y 40 µg/mL) en co-tratamiento con MMS 0.5 mM.....	- 37 -

Figura 11 Ciclo de vida de *Drosophila melanogaster* - 49 -

Figura 12 Eventos genéticos que generan la pérdida de heterocigosis de los marcadores flr3 y mwh y su expresión fenotípica..... - 50 - 53 -

+ positivo

- negativo

★ estadísticamente significativo

µg/mL microgramos sobre mililitros

µM micro molar

CBE cruza biactivación elevada

CE cruza estándar

CYP450s citocromos P450

DNA deoxyribonucleic acid (por sus siglas en ingles)

EtOH etanol

flr³ flare

H₂O₂ peróxido de hidrógeno

HR humedad relativa

mM milimolar

MMS metil metanosulfonato

MN micro núcleos

mwh multiple wing hair

N3A nitrogeno 3 de adenine

N7G nitrogeno 7 de la guanine}

-OH radical hidroxilo

O₂ radical superóxido

RES resveratrol

ROS especies reactivas de oxígeno

UV ultra violeta

RESUMEN

Todos los seres vivos están expuestos a múltiples agentes, que pueden alterar la estructura química básica de sus moléculas, tales como las especies reactivas de oxígeno (ROS) que incluyen radicales libres derivados del oxígeno molecular; éstas generan estrés oxidante y daño a diversas moléculas celulares como lípidos, proteínas y ácidos nucleicos; en estos últimos generan daños que han sido relacionados con la mutagénesis, la oncogénesis y el envejecimiento. Para reducir el daño que generan las ROS se ha propuesto el uso de diversos compuestos quimiopreventivos como el Resveratrol (RES), un polifenol producido por diferentes plantas y al que se le atribuyen propiedades antioxidantes, efectos antitrombogénicos, antiinflamatorios, y antitumorales. Sin embargo, la actividad antigenotóxica del RES no se ha demostrado con claridad en sistemas *in vivo*, y no existen evaluaciones que sugieran que este compuesto pueda aumentar o disminuir el daño genotóxico de algún compuesto con el que se administre. Por otro lado se ha demostrado que el metabolismo del RES por medio de los CYP450s, juega un rol primordial para la acción o efecto que éste pueda tener, ya sea como antioxidante, pro-oxidante o anticancerígeno. Por lo anterior, se evaluó la posible actividad moduladora del RES ante el daño ocasionado por el agente alquilante metil metanosulfonato (MMS), que genera de manera indirecta estrés oxidante, con la prueba SMART en ala de *Drosophila melanogaster* cruza bioactivación elevada (CBE) que tiene niveles altos de Cyp450s. Al comparar estadísticamente los tratamientos RES (2.5, 10 y 40 µg/mL) contra MMS 0.5 mM, sólo se obtuvieron diferencias significativas con la concentración 10 µg/mL donde hubo un aumento de manchas grandes y totales y una alteración en la distribución acumulada de los clones *mwh*. Se propone que estos efectos se deban a un efecto pro-oxidante agregado del RES y el MMS, en las células de los discos imaginales del ala de las larvas tratadas con dicha concentración. También se obtuvieron diferencias significativas entre los tratamientos control MMS 0.5 mM/EtOH 1% y MMS 0.5 mM/Agua; dada la semi-polaridad del EtOH 1% se propone que este disolvente haya favorecido la entrada del MMS a través de membranas y que por ello el daño genotóxico fue mayor con éste.

Palabras clave: antioxidante, Resveratrol, quimiopreventivo, genotóxico, *in vivo*.

ABSTRACT

All living beings are exposed to multiple agents that can alter their basic chemical structure, such as Reactive Oxygen Species (ROS) including free radical derived from molecular oxygen; these ROS generate oxidative stress and damage several cell molecules such as lipids, proteins and nucleic acids; damages on the nucleic acids has been related to mutagenesis, oncogenesis and ageing. In order to reduce the damage generated by ROS the use of several chemopreventive compounds has been proposed; Resveratrol (RES), a polyphenol produced by different plants, has been attributed antioxidant properties as well as antitrombogenic, anti-inflammatory and antitumoral effects. However, the antigenotoxic activity of RES has not been clearly shown in *in vivo* systems, and there are no assessments that suggest this compound can increase or decrease the genotoxic effect of any compound co administered with it. On the other hand, it has been shown that RES metabolism by CYP450s plays a main role for its activity or effect as antioxidant, pro-oxidant or anticancer Therefore, we tested for the modulating activity of RES to the damage caused by methyl methanesulfonate (MMS), an alkylating agent that generates indirect oxidative stress, in the *Drosophila melanogaster* wing spot test high bioactivation (HB) cross with high levels of CYP450s. Statistical comparison of RES treatments (2.6, 10 and 40 µg/ mL) against MMS (0.5 mM) showed significant differences with the 10 µg/ mL concentration with an increase of large and total spots and a change in the accumulated distribution of the *mwh* clones. It is proposed that these effects are due to a synergic pro-oxidant effect of RES and MMS in the wing imaginal disc cells of larvae exposed to this concentration. There were also significant differences between the control treatments MMS 0.5 mM/EtOH 1% and MMS 0.5 mM/Water; given the semi polarity of EtOH 1% we proposed it favored the MMS intake through de cell membranes allowing a greater damage.

Key words: antioxidant, Resveratrol, chemopreventive, genotoxic, *in vivo*.

INTRODUCCIÓN

Todos los organismos están expuestos a diversos agentes que pueden alterar la estructura química básica de su material genético, ejemplos son: la luz ultravioleta, los metabolitos producidos por otros organismos, e incluso las especies reactivas de oxígeno (ROS) (Guerrero *et al.*, 2005).

Las ROS son moléculas reactivas y radicales libres derivados del oxígeno molecular, que se generan como producto durante el transporte electrónico mitocondrial, por la acción de las enzimas oxidorreductasas, o por el daño indirecto que pueda causar algún agente mutágeno, así como compuestos oxidantes o reductores externos. Numerosos estudios han demostrado el papel de las ROS en el desarrollo de estrés oxidante que induce la oxidación de diversas moléculas celulares tales como lípidos, proteínas y ácidos nucleicos, por ende generan daño implicado en la mutagénesis, la oncogénesis y el envejecimiento. El daño oxidante al material genético incluye modificaciones de bases, rupturas de cadena y sitios abásicos (sitios AP) (Ahmad *et al.*, 2005; De la Lastra *et al.*, 2007).

Debido a la acumulación del daño genotóxico en el DNA, estas moléculas tiene el potencial para causar diversos eventos. Se ha demostrado que las ROS juegan un papel importante en la señalización celular, incluyendo la apoptosis, expresión de genes y activación de cascadas de señalización celular; y al igual que a la exposición a agentes que alteran el material genético pueden generar como consecuencia un crecimiento anormal y descontrolado de las células (Paul, 2010; Hancock *et al.*, 2001). Para ello se ha propuesto la utilización de diversos compuestos quimiopreventivos que ayuden a reducir o combatir el daño que pueda causarse por la exposición a estos agentes.

La quimiopreención se define como la prevención, inhibición, o retraso de la carcinogénesis, mutagenesis o del envejecimiento por la administración de una o más entidades químicas, ya sean drogas individuales o componentes naturales de la dieta (Namasivayam, 2011; Morse *et al.*, 1993). Diversos estudios han demostrado que el consumo de vegetales ayuda a reducir el riesgo de desarrollar distintos tipos de cáncer (Safe *et al.*, 1999). Aunque la naturaleza de los constituyentes que son responsables de la reducción del riesgo no ha sido completamente aclarada, se ha demostrado que los

alimentos vegetales contienen agentes quimiopreventivos como: vitaminas, minerales, compuestos orgánicos de azufre, polifenoles, entre los que se encuentra el resveratrol (RES) e isoflavonoides, entre otros (Namasivayam, 2011).

RESVERATROL (RES)

El resveratrol (3,5,4'-trihidroxiestilbeno) pertenece al grupo de los fitoquímicos y de entre ellos a los polifenoles; es producido por una gran variedad de vegetales en respuesta a condiciones de estrés, a radiación UV e infecciones fúngicas, entre otros factores; se puede encontrar como isómero *cis* y *trans* predominando este último. El RES es insoluble en agua, pero soluble en etanol, carboximetilcelulosa y dimetilsulfóxido. La estructura de la base de estilbeno del RES consiste en dos anillos fenólicos ligados por un doble enlace de estrieno (Figura 1).

El RES es capaz de estimular genes de la familia *SIRT1* que codifican a las sirtuinas (desacetilasas de histonas dependientes del NAD) que son promotoras de la resistencia al estrés oxidante y al envejecimiento, al inhibir la expresión de los genes controlados por el receptor nuclear PPAR- γ (Li *et al.*, 2013). Las sirtuinas promueven la movilización de los ácidos grasos desde el adipocito y evitan su almacenamiento; asimismo, actúan sobre la biogénesis mitocondrial reduciendo las ROS y previniendo el envejecimiento; por lo anterior, incrementa la resistencia al estrés oxidante, mediante el aumento de la actividad antioxidante a través de enzimas como la catalasa (Celis *et al.*, 2008). El RES es conocido por ser un potente antioxidante exógeno en mamíferos; los estudios realizados con él muestran que presenta efectos antitrombogénicos, antiinflamatorios, antitumorales, antiosteoporóticos y antimicrobianos (bacterias, virus y hongos) (Baur *et al.*, 2006; Aggarwal *et al.*, 2004); por otro lado, existen datos que sugieren que el RES presenta un efecto de hormesis, dependiente de la dosis, en un amplio rango, en diferentes modelos biológicos, afectando numerosos criterios de valoración biomédica y significancia terapéutica; se ha observado este efecto en diversas líneas celulares derivadas de tumores de mama, próstata, colon, útero y leucemia (Calabrese *et al.*, 2010).

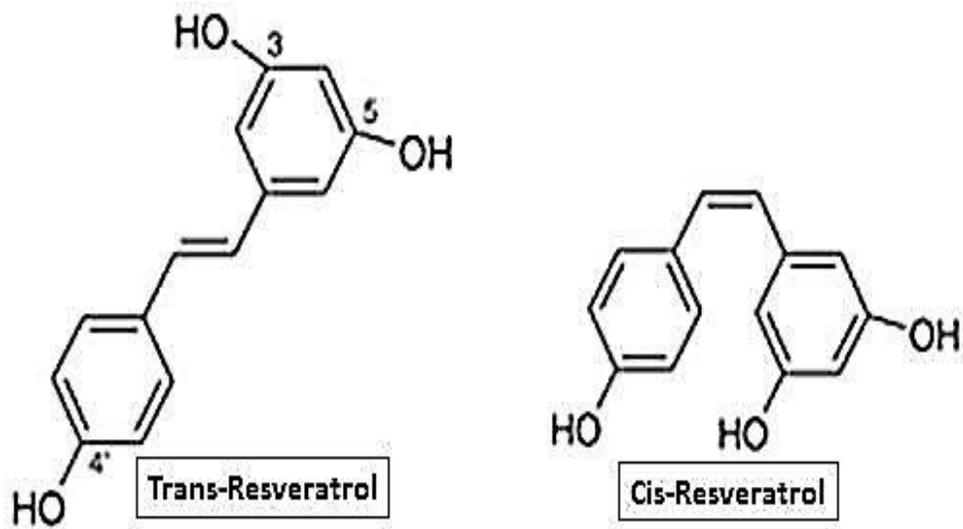


Fig. 1. Estructuras químicas del resveratrol, de sus formas *trans* o *cis*. (Modificado de Delmas *et al.*, 2011).

Actividad del RES

La actividad anticancerígena del RES se ha probado en diferentes tipos de células cancerígenas, vinculándose con diferentes vías celulares que conllevan a eventos tales como el arresto del ciclo celular, la apoptosis y la autofagia, principalmente. Tang y colaboradores en 2013, probó dichas actividades en carcinoma de células escamosas del esófago, encontrando que el RES a concentraciones 25,50,100 y 200 μM , inhibe el crecimiento de este tipo de células en una manera dosis dependiente, proponiendo que esta actividad se debe a la participación del RES en diferentes vías que inducen muerte celular, concordando con el trabajo de Zhang y colaboradores en 2013, quienes observaron que RES tiene participación en la inactivación de la vía mTOR, así como la activación de caspasas-3 y cambios morfológicos de células de cáncer de pulmón. Además, se ha demostrado que RES permite la expresión del gen *TP53* encargado de suprimir células dañadas, así como la inhibición de proteínas asociadas a la metástasis, lo cual permite la apoptosis de células cancerígenas de próstata (Kai *et al.*, 2010). En el mismo contexto, aunque, la actividad antioxidante del RES se relaciona con la protección celular frente al daño oxidante, a ciertas concentraciones se ha demostrado que presenta actividad pro-oxidante la cual está ligada a la capacidad citotóxica o a efectos pro-apoptóticos en células cancerígenas (Kucinska *et al.*, 2014). Diversos estudios proveen información acerca de los efectos en el estado redox intracelular por parte del RES, el cual conlleva a rompimientos del DNA debido a su oxidación, dependiente de la concentración y del tipo de célula, de esta manera se ha propuesto que la actividad pro-oxidante sea importante en los mecanismos de acción anti cancerígenos que presenta el RES (Ahmad *et al.*, 2003).

Por otro lado, la actividad del RES como agente quimiopreventivo se ve ligada a su potencial para inhibir ciertas isoformas de los citocromos P450 en humanos (CYP450s), tales como CYP3A4, CYP1A1, enzimas que actúan en la Fase 1 del metabolismo xenobótico y que están relacionadas con la bioactivación de moléculas pro-cancerígenas (Mohammadi *et al.*, 2012; Zhou *et al.*, 2005). También, se ha demostrado que el RES es metabolizado por las isoformas CYP1B1 y CYP1A2, transformándolo a picetanol (Figura 2) como un producto de su oxidación, siendo éste uno de sus principales metabolitos al cual se le atribuyen ciertas propiedades anticancerígenas, ya que participa en la muerte y el arresto del ciclo celular (Kim *et al.*, 2009., Piver *et al.*, 2004 Potter *et al.*, 2002). De esa

manera, se ha demostrado que el metabolismo del RES por parte de los CYP450s, juega un rol primordial para la acción o efecto que éste pueda tener, ya sea como antioxidante, pro-oxidante o anticancerígeno (Kucinska *et al.*, 2014.,Piotrowska *et al.*, 2012., Steenwyk *et al.*, 2010., Szekeres *et al.*, 2010).

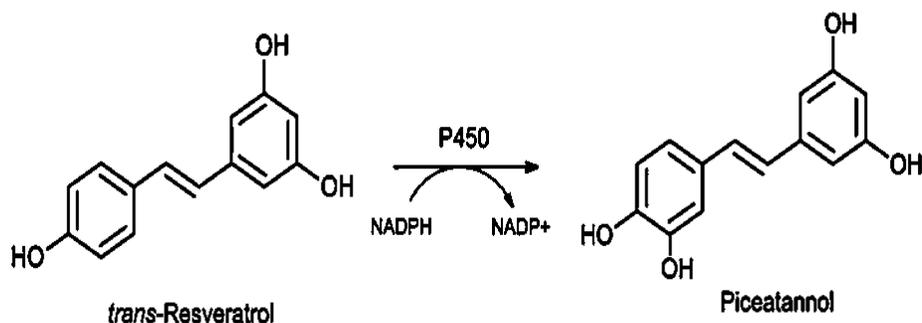


Fig. 2. Oxidación del RES catalizada por los CYP450s. Conversión del *trans*-resveratrol a piceatannol en presencia de NADPH (Tomado de Kim *et al.*, 2009).

El RES a concentraciones de entre 1-100 $\mu\text{M/L}$ se ha demostrado que inhibe significativamente la producción de ROS intra y extra celular (Jang *et al.*, 2001). Dicha actividad antioxidante se ha vinculado recientemente a la estructura conformacional del mismo y a los cambios que ésta pueda presentar debido a su metabolismo; bajo estos términos RES tiene tres sitios de actividad antioxidante, 3-OH, 5-OH y 4'-OH, de los cuales el más activo es el 4'-OH ya que presenta mayor afinidad hacia los radicales libres, de tal manera que, cuando existe algún cambio en la estructura del RES y que este afecte la posición o conjugación con otras moléculas de los sitio de actividad antioxidante del RES se puede disminuir dicha actividad (Lu *et al.*, 2013). Por otro lado, se ha observado la participación del grupo 4'-OH del RES en la actividad genotóxica que éste pueda presentar; se propone que modificaciones químicas en los sustituyentes de este grupo en el RES genera diversos análogos los cuales presentan reducción en la actividad genotóxica, mientras que y de acuerdo a las modificaciones, puede actuar como homólogo a otros compuestos y participar en otras vías; también se ha demostrado que algunos análogos productos del metabolismo de RES pueden elevar su genotoxicidad (Matsuoka *et al.*, 2002; Schmitt *et al.*, 2002). Aunado a esto, el RES es un potente inhibidor de la nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADP) y de la peroxidación lipídica, efectos relacionados directamente con su actividad antioxidante (Miura *et al.*, 2000).

AGENTES ALQUILANTES

Los agentes alquilantes son primordialmente agentes metilantes y etilantes y no son considerados generalmente como contaminantes medioambientales, pero son compuestos modelos para el estudio de diversas enfermedades por la forma reactiva de algunos alquil carcinógenos. Los agentes alquilantes se dividen en diferentes grupos: los alquil sulfatos como el dietilsulfato (DES) y el dimetil sulfato (DMS); los alcanosulfantes como el metil metanosulfonato (MMS) y el etil metanosulfonato (EMS); y las nitrosamidas, como la metil urea y la etil nitrosourea (MNU, ENU) que son agentes directos, y las que actúan indirectamente: dimetil nitrosamina (DMN) y dietil nitrosamina (DEN) (Beranek, 1990). Los alquilsulfatos fueron inicialmente desarrollados como esterilizantes químicos para insectos y plagas de mamíferos, también fueron considerados para su uso como anticonceptivos en humanos (Jackson, 1964), aunque actualmente son utilizados como pesticidas y algunos como terapias anticancerígenas, por su alta toxicidad. Los agentes alquilantes atacan varios sitio en el DNA entre los que se encuentran el N-7 de la guanina, la alquilación en esta posición favorece la ionización y deionización, lo que lleva a mutaciones de transición de GC por AT. También existen alquilaciones ligadas al O⁶ y N-3 de la guanina y al O⁴ de la timina como fuentes principales de mutación. (Wyatt *et al.*, 2006) (Figura 3).

METIL METANOSULFONATO (MMS)

El metil metanosulfonato (MMS) (Figura 4) es un agente alquilante del DNA altamente tóxico, que actúa de manera directa y tiene afinidad alta por los centros nucleofílicos; metila principalmente el N7 de la guanina (N7-G) y el N3 de la adenina (N3-A) (Tabla I) transfiriendo un grupo metilo (CH₃⁺) (Jenkins *et al.*, 2005) lo que posteriormente conduce a rupturas cromosómicas, recombinación somática, formación de micronúcleos, aductos y muerte celular (Wyatt *et al.*, 2006). El MMS se ha utilizado por muchos años como un agente químico que daña al DNA y se usa en el campo de la investigación del cáncer; ha sido usado en quimioterapia para el tratamiento de diversos cánceres humanos; sin embargo su metabolismo y mecanismo de citotoxicidad no se entiende completamente (Lee *et al.*, 2007). Por otro lado, debido a la reparación deficiente del DNA, el MMS se

considera un agente oxidante indirecto, es capaz de generar ROS, principalmente el radical $\cdot\text{OH}$ y el H_2O_2 (Rowe *et al.*, 2008). El MMS genera estrés celular activando diferentes proteínas involucradas en diversas vías que son activadas en respuesta al daño que causan los agentes alquilantes, al aumentar la actividad de estos mecanismos se genera indirectamente el estrés celular, asociándose éste a la toxicidad del MMS (Wilhem *et al.*, 1997).

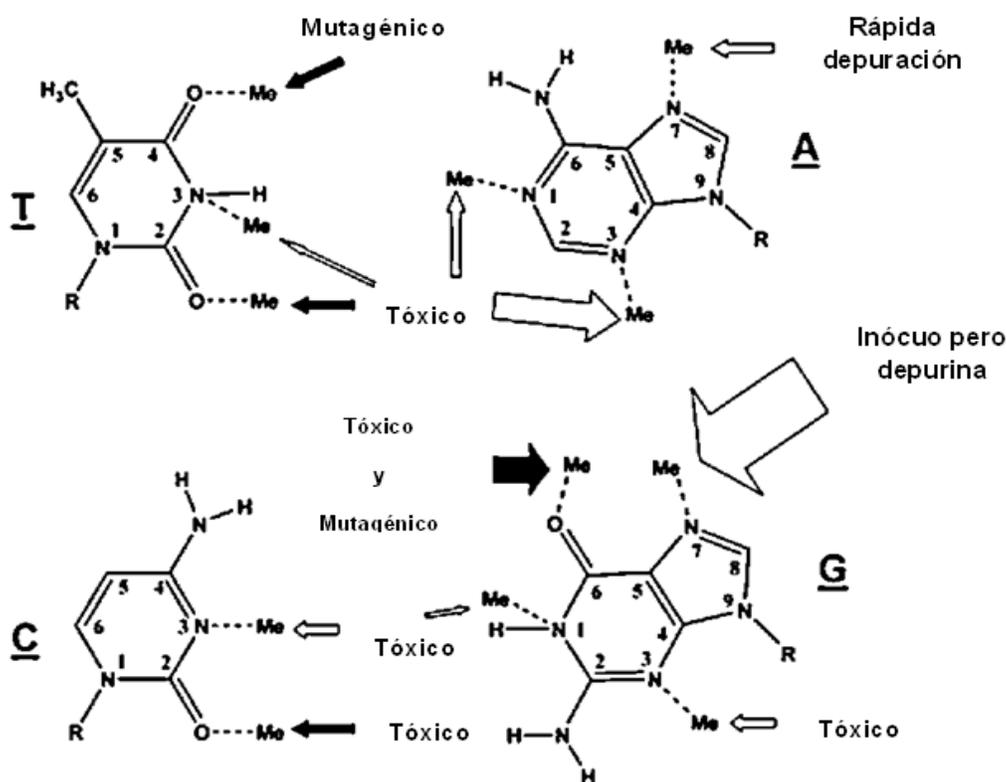


Fig. 3. Potenciales sitios de metilación del DNA, asociados a la toxicidad y mutagénesis de los agentes alquilantes (Tomado de Wyatt *et al.*, 2006).

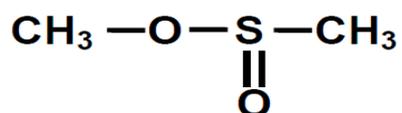


Fig. 4. Estructura química del metil metanosulfonato (Tomado de Tao *et al.*, 1993).

Tabla 1. Muestra los sitios de metilación por varios agentes alquilantes dentro de ellos el MMS el cual presenta una afinidad por el N-3 de la adenina y el N-7 de la guanina, con 10.4-11.3 y 81.0-83.0 de porcentaje de alquilación, respectivamente (nd=no daña) (Tomado de Beranek, 1990).

Metilación del DNA expresada en porcentaje total de alquilación				
Sitio de alquilación	DMS	MMS	MNU	MNNG
Adenina				
N1-	1.0- 3.0	1.9- 3.8	0.7- 1.3	1.0
N3-	15.0-18.0	10.4-11.3	8.0- 9.0	12.0
N ⁶ -	-	nd	nd	-
N7-	2.0	1.8	0.8- 2.0	-
Citosina				
O ² -	nd	nd	0.1	-
N3-	< 2.2	<1.0	0.06- 0.6	2.0
Guanina				
N1-	-	nd	nd	-
N3-	1.1- 1.3	0.6	0.6- 1.9	-
O ⁶ -	0.2- 0.3	0.3	5.9- 8.2	7.0
N7-	71.0-76.0	81.0-83.0	65.0-70.0	67.0
Timidina				
O ² -	-	nd	0.1- 0.3	-
N3-	-	0.1	0.1- 0.3	-
O ⁴ -	-	nd	0.1- 0.7	-

CITOCROMOS P450

Las enzimas de los citocromos P450 (CYP450s) son una familia de proteínas de membrana con un grupo hemo (complejo de Fe porfirina) que se localizan en el lado citoplásmico del retículo endoplásmico liso, distribuidas ampliamente en todos los seres vivos. La P significa pigmento y el número 450 corresponde a la longitud de onda a la cual presenta la mayor absorción a la luz cuando se une al monóxido de carbono (CO). Estas enzimas participan en el metabolismo xenobiótico, permitiendo la bio-transformación de fármacos, contaminantes del ambiente y otros xenobióticos (Vázquez *et al.*, 2008). Cada una de las cuales posee especificidad por el sustrato, de acuerdo a las características estructurales de cada compuesto; sin embargo, suele haber muchos puntos comunes, por

ello en la biotransformación de algún compuesto pueden intervenir varias isoformas originando múltiples metabolitos (Guengerich, 1993). Asimismo, los CYP450s son responsables de la activación de diversos agentes mutagénicos aumentando la genotoxicidad en el organismo, misma que promueve la sobreexpresión de genes involucrados en la carcinogénesis (Leclerc *et al.*, 2011). De igual manera se ha reportado que el aumento de los CYP450s, y por ende su actividad continua, tiene como resultado la producción de ROS, ya que están involucrados en el metabolismo oxidante de una gran variedad de xenobióticos. El ciclo catalítico de los CYP450s tiene como resultado una producción continua de ROS; también es capaz de producir estas últimas al tener efecto en diferentes vías de señalización y en algunas funciones celulares que conllevan a la peroxidación de lípidos y al estrés oxidante (Zangark *et al.*, 2004).

SMART en ala y citocromos P450 de *Drosophila melanogaster*

SMART (Prueba de Recombinación y Mutaciones Somáticas) en ala de *D. melanogaster* brinda una serie de ventajas relacionadas con la detección de compuestos genotóxicos ya que es un ensayo que se evalúa en una sola generación, es *in vivo* y utiliza marcadores recesivos que se expresan en la superficie de las alas de la mosca adulta. Esta prueba se basa en la pérdida de heterocigosis de dichos marcadores, provocada por el tratamiento con agentes genotóxicos que producen mutación, deleción, aneuploidía y recombinación somática (ver anexo 1 y 2), que afectan a las células de los discos imaginales de las larvas conduciendo a la formación de clones de células mutadas que se expresan en las alas del organismo adulto (Graf *et al.*, 1984).

La evaluación de la posible actividad moduladora del RES contra el MMS se ha evaluado con la prueba SMART en ala *D. melanogaster* en la craza estándar (CE), la cual se caracteriza por presentar los citocromos P450 (Cyp450s) regulados e inducibles; y debido a que RES es metabolizado por alguna(s) de estas proteínas, resulta primordial evaluar su actividad en la craza bioactivación elevada (CBE) de SMART en ala, caracterizada por tener una expresión alta de los niveles de Cyp450s.

ANTECEDENTES

En relación a la actividad genotóxica del RES: Mitrut y colaboradores, en el 2009, estudiaron la genotoxicidad del RES en cultivo de células de adenocarcinoma gástrico, con ensayo de micronúcleos (MN) a las concentraciones de 5, 10 y 20 µg/mL en 48 y 72 h. Observaron a las 72 horas un incremento en la frecuencia de micronúcleos dependiente de la concentración, no teniendo algún resultado significativo a las 48 h.

En el 2002, Matsuoka y colaboradores, investigaron la actividad citogenética del RES y seis de sus análogos, con las pruebas de intercambio entre cromátidas hermanas (ICH), MN y aberraciones cromosómicas; mostraron que cambios en la estructura del RES afectan la actividad genotóxica y que esta presenta en una forma dependiente de la concentración; que los análogos que presentan cambios en el grupo 4'-OH y que tienen la estructura química básica del RES presentan una mayor actividad genotóxica y que 10 µg/mL fue la dosis con mayor actividad.

Kucinska y colaboradores, en el 2014, determinaron los efectos oxidantes, apoptóticos y citotóxicos del RES y de tres análogos hidroxilados de éste en el estrés oxidante en células Jurkat T de leucemia, determinando la actividad citotóxica, a través de los valores de CL₅₀ obtenidos con el azul de Alamar, en diferentes concentraciones cada uno. Observaron para algunos derivados y RES un incremento en la actividad de las caspasas 3 y 9, una muerte celular relacionada a un bajo potencial mitocondrial, estrés oxidante y disminución de niveles de la superóxido dismutasa (SOD), relacionando la actividad prooxidante del RES con su actividad citotóxica.

En el estudio elaborado por Chen *et al.* (2013), se probó la actividad moduladora del RES en la toxicidad inducida por el arsenito de sodio (NaAsO₂) en células A549 de adenocarcinoma humano; estos autores determinaron la viabilidad celular midiendo la actividad de la SOD y la cantidad intracelular de ROS; además, realizaron el ensayo cometa y la prueba de MN, para medir el daño al material genético. Utilizaron concentraciones variadas de RES de entre 1-20 µM; obtuvieron como resultados que el RES a concentraciones de 1-5 µM promueve la viabilidad celular y la proliferación, pero a 20 µM inhibe la sobrevivencia celular al aumentar el daño cromosómico y del DNA,

además del estrés oxidante. Concluyen que los efectos del RES dependen de la concentración, observando efectos benéficos a concentraciones bajas de entre 1-5 μM .

García, en el 2012, evaluó la actividad del RES en ausencia y presencia de MMS con el ensayo SMART en ala de *D. melanogaster* cruza estándar (CE), que tiene niveles basales e inducibles de Cyp450s, probando el RES a concentraciones 2.5, 10 y 40 $\mu\text{g/mL}$. El RES no tuvo efecto modulador al administrarlo con MMS 0.5 mM. Sin embargo, el RES solo, mostró daño genotóxico y afectación de la división celular a la concentración de 2.5 $\mu\text{g/mL}$, proponiendo que este daño pudiera deberse a algún efecto pro-oxidante por parte del RES; concluye que dada la literatura científica, el RES tiene diversos efectos dependiendo de la concentración y del modelo biológico; esta propuesta se sustenta con lo reportado por Sloan y colaboradores (2012), quienes al evaluar el efecto antitumoral del RES en un modelo de cáncer de ovario NuTu-19 *in vitro* obtuvieron un efecto antioxidante y con los mismos parámetros en rata *in vivo* no observaron ningún efecto de RES.

Schmitt y colaboradores, en el 2002, probaron la posible actividad genotóxica y hormonal del RES, en cultivo de células L5178Y de linfoma de raton, con el ensayo de MN, además de medir la proliferación, viabilidad y ciclo celular; encontraron que el RES es capaz de actuar como diversas hormonas, en especial la dietilestilbestrol (DES), siendo capaz de inhibir el ensamble micro-tubular y causar disturbios mitóticos, lo cual se ve ligado directamente al arresto del ciclo celular, aunque en comparación con dicha hormona el RES solamente produce 46% de MN mientras que el DES produce 81%. En contraste, el RES detiene el ciclo celular en la fase G1 mientras que el DES lo hace en la fase G2, este efecto se puede observar a concentraciones mayores de 10 μM de RES.

JUSTIFICACIÓN

Debido al aumento de los casos de cáncer en los países en desarrollo, sus efectos deletéreos en la familia y en la salud pública, ésta se ha convertido en una de las principales enfermedades a combatir con una alta prioridad. Para ello se han realizado diferentes investigaciones que implementan el uso de distintos compuestos, tanto naturales como sintéticos, que permitan abatir dicha enfermedad, de tal manera el uso del RES como agente anticancerígeno o quimiopreventivo ha ido aumentando considerablemente, adquiriendo importancia en la investigación para poder evaluar todos sus posibles efectos, entre ellos su actividad antígenotóxica y la acción que pueda presentar al asociarse con diferentes compuestos que presenten actividad mutagénica; los estudios que existen acerca del efecto anticancerígeno de este agregado natural indican que puede tener resultados contraproducentes dependiendo del compuesto al que se vea vinculado y la dosis que se administre del mismo, además de que la mayoría de estos estudios han sido realizados en modelos *in vitro*, dejando así preguntas acerca de los efectos que el RES podría tener en pruebas *in vivo*, en especial sobre su actividad genotóxica, misma que carece de evaluación; por otro lado, se ha vinculado la transformación del RES vía CYP450s, los cuales son capaces de generar estrés oxidante, originando distintos metabolitos asociados a las diferentes actividades que pueda presentar el RES. De igual forma, se sabe que el RES es una molécula que en determinadas condiciones presenta acción pro-oxidante la cual se ve ligada a la citotoxicidad; por ello resulta indispensable evaluar la actividad genotóxica del RES en un modelo *in vivo*, que nos permitirá entender mejor su funcionamiento como un potencial agente quimiopreventivo y sus posibles efectos al administrarse con diferentes compuestos. Por lo anterior, este trabajo pretende evaluar la posible actividad moduladora del RES hacia la actividad genotóxica del MMS, con SMART en ala de *Drosophila melanogaster* Cruza Bioactivación Elevada, que tiene niveles altos de Cyp450s.

HIPÓTESIS

Considerando que el RES es potencialmente antioxidante o pro-oxidante, se espera que sea capaz de modular el daño genotóxico generado por el MMS en la CBE por tres razones: (1) el MMS se ha relacionado con la producción indirecta de ROS; (2) la CBE tiene niveles altos de los Cyp450s que producen ROS; (3) el RES es metabolizado por los Cyp450s.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar la posible actividad moduladora del RES ante la actividad genotóxica del MMS utilizando SMART en ala de *D.melanogaster* (Cruza Bioactivación Elevada).

OBJETIVOS PARTICULARES

- Comparar la actividad genotóxica de los disolventes utilizados en los tratamientos con RES y MMS
- Determinar si se modifica la frecuencia de todos los tipos de manchas sobre el daño producido por MMS en las alas de *D. melanogaster* (CBE), con los diferentes tratamientos de RES y de los co-tratamientos RES/MMS..
- Determinar la modificación de las frecuencias acumuladas de los tipos de clones *mwh*, de las células de los discos imaginales del ala de *D. melanogaster* (CBE), con los diferentes tratamientos de RES y de RES/MMS.

MATERIALES Y MÉTODOS

QUÍMICOS

RES (isómero *trans*) aislado de *Yucca periculosa*. Donado por la Dra. Ana María García Bores FES-I, UNAM, del Laboratorio de Fitoquímica (UBIPRO).

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

Etanol grado reactivo (CAS 64-27-5, pureza 99%). Obtenido de ©Merck KGaA (Darmstadt, Alemania).

Medio instantáneo *Drosophila* (DIM) obtenido de *Carolina Biological Supply Co* (Burlington, North Carolina, EUA).

SMART EN ALA.

La propagación de las cepas *mwh* y *flr³/TM3,Bd^S* (donadas originalmente por el Dr. Ulrich Graf, del ETH, Zurich, Suiza) se realizó en el medio de cultivo con 5 g de hojuela de papa, hidratados con 20 mL de solución conservadora, (5 mL tegosep 12% y 5 mL de ácido propiónico, aforados a 1 L), como bactericida y fungistático respectivamente, y manteniéndolas a una temperatura de $24^{\circ} \pm 2^{\circ} \text{C}$ y 65% de humedad relativa (HR) en total oscuridad (Dueñas *et al.*, 2001).

Para realizar la CBE se colocaron los organismos bajo el microscopio estereoscópico y se aislaron 200 hembras vírgenes de la cepa *flr³/TM3,Bd^S* así como 100 machos de la cepa *mwh/mwh*.

La CBE *flr³/TM3,Bd^S x mwh/mwh* se realizó manteniendo a los individuos durante tres días en medio de cultivo de hojuela de papa hidratada con solución conservadora, a una

temperatura de $25^{\circ} \pm 2^{\circ} \text{C}$ y 65% HR en total oscuridad. Una vez hecha la CBE se colectaron los huevos por 8 h en botellas de cultivo con levadura activada con sacarosa. Después de 72 ± 4 h se obtuvieron con agua corriente y una coladera de malla fina las larvas del tercer estadio las cuales fueron sometidas a los tratamientos con RES (2.5, 10 y 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$) disuelto en EtOH 1%, y MMS (0.5 mM) disuelto en agua así como los co-tratamientos RES/MMS (Tabla 2).

Tabla 2. Tratamientos administrados a las larvas de tercer estadio para evaluar la actividad de RES/MMS con SMART; se utilizaron como testigos RES 2.5, 10 y 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ disuelto en EtOH 1% y en co-tratamiento con MMS 0.5 mM disuelto en agua; como testigos positivos se utilizó MMS 0.5 mM disuelto en EtOH 1% o en agua miliQ y como testigos negativos se usaron EtOH 1% y Agua miliQ.

TRATAMIENTOS	
TESTIGOS NEGATIVOS	
Etanol (EtOH) 1%	
Agua	
TESTIGOS POSITIVOS	
MMS 0.5 mM + EtOH 1%	
MMS 0.5 mM + Agua	
TESTIGOS RES	
RES 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ + EtOH 1%	
RES 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ + EtOH 1%	
RES 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ + EtOH 1%	
CO-TRATAMIENTOS RES/MMS	
RES 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ + MMS 0.5 mM	
RES 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ + MMS 0.5 mM	
RES 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ + MMS 0.5 mM	

Tres experimentos independientes se hicieron con tres réplicas por tratamiento. Todos los tratamientos se realizaron en medio instantáneo para *Drosophila* (DIM) (*Carolina Biological Supply Company, USA*) y fueron incubados a $24 \pm 2^\circ\text{C}$ y 65% HR hasta completar su desarrollo en adultos. Después de la emergencia de las moscas, se colectaron los imagos en alcohol 70%; a los individuos con ala de fenotipo silvestres trans-heterocigotos se les disecaron las alas para elaborar preparaciones permanentes, mismas que se hicieron colocando las alas en un portaobjetos con solución de Entellan® con proporción 1:1 de hembras y machos por tratamiento. Se analizaron de 35-60 individuos por tratamiento, tamaño óptimo 55, siempre que fuera posible, de la muestra para esta prueba (Frei y Würgler, 1995). Tanto la superficie ventral como la dorsal de las alas se observó usando un microscopio a 40x registrando el número y tipo de mancha o clones de células mutantes presentes de acuerdo con Graf *et al.* (1984). Se buscó si había manchas simples (fenotipos *mwh* y *flr*³) pequeñas o grandes, o manchas dobles (gemelas) (clones *mwh* adyacentes a los clones *flr*³).

Para el análisis estadístico se utilizó el programa para PC SMART versión 2 (Frei y Würgler, 1988) que evalúa con una regla de decisión múltiple basada en la prueba de Kastenbaum–Bowman ($p < 0.05$) la cual decide la frecuencia de manchas inducidas en los tratamientos, arrojando datos positivos, débil positivos, negativos o indecisos de acuerdo a las siguientes hipótesis:

- Hipótesis nula (H_0): la frecuencia de mutaciones inducidas y espontánea en los individuos tratados no es significativamente mayor a la frecuencia del testigo negativo.
- Hipótesis alternativa (H_a): la frecuencia de manchas inducidas y espontáneas en los individuos tratados es “m” veces mayor a la frecuencia del testigo negativo (Graf *et al.*, 1984). En el cual “m” es un factor de multiplicación de riesgo mínimo que se utiliza en el análisis estadístico e indica las veces que debe incrementarse el número de eventos de los tratamientos con respecto al testigo para considerarlo como una respuesta positiva.

Al ser más comunes las manchas pequeñas (1-2 células) van a predominar en relación a la frecuencia de machas grandes (más de 3 células) y manchas gemelas, por lo cual el programa las analiza por separado evitando así la sobre estimación de las manchas menos comunes. De esta forma, para considerar un incremento significativo en la frecuencia de manchas pequeñas y totales (obtenida de la suma de todas las manchas)

se utiliza $m=2$, mientras que para manchas grandes y gemelas se utiliza $m=5$. Por lo tanto son posibles las siguientes decisiones (Frei y Würzler, 1988):

- Aceptar H_0 y rechazar H_a : negativo.
- Rechazar H_0 y aceptar H_a : positivo.
- Rechazar H_0 y rechazar H_a : indeciso.
- Aceptar H_0 y aceptar H_a : débil positivo.

Para eliminar los débiles positivos se usó la prueba U de Mann-Whitney-Wilcoxon ($p<0.05$) la cual considera la variabilidad individual, en el programa STAT graphics versión 6.0 a $p<0.05$. Además, se aplicó la prueba no paramétrica de Kolmogorov-Smirnov, ($p<0.05$) para determinar la diferencia estadística en la distribución acumulada del tamaño de los clones *mwh* y se comparó contra sus respectivos testigos para evaluar si la división celular fue alterada con algún tratamiento.

De manera adicional a este experimento, con el objetivo de corroborar las líneas genéticas para la CBE que se utilizó en este trabajo, se compararon los resultados obtenidos en SMART con uretano en una CE contra los resultados de SAMRT con uretano en la CBE de la misma línea usa para esta investigación, ya que uretano es un mutágeno indirecto que requiere de la metabolización por CYP450s para llevar a cabo su acción genotóxica, y corroborando que no se había perdido la línea genética.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

En este trabajo se propuso evaluar la posible actividad moduladora del RES ante la genotoxicidad causada por MMS, por su capacidad de generar estrés oxidante de forma indirecta (Rowe *et al.*, 2008), asimismo, se ha documentado que RES presenta actividad antioxidante, antimutagénica y apoptótica entre otras (Tang, 2013), y se ha reportado a RES como un agente pro-oxidante con efectos citotóxicos y genotóxicos (Kucinska *et al.*, 2014). En la Tabla 3 se muestran los resultados obtenidos con la prueba SMART en ala de *D. melanogaster* después de analizar las frecuencias con los estadísticos descritos anteriormente (Frei y Würigler, 1988).

Tabla 3. Resumen de los resultados obtenidos con SMART en ala de *Drosophila melanogaster* en la progenie transheterocigota después de alimentar crónicamente larvas de (72 ± 4 h) con RES (2.5, 10 y 40 µg/mL) solo o en co-tratamiento con MMS (0.5 mM); como testigos negativos se usaron EtOH 1% y agua miliQ; como testigos positivos se utilizó MMS/Agua y MMS/EtOH 1%.

Tratamiento	Número de individuos	Pequeñas (1-2 células) m=2			Grandes (> 2 células) m=5			Gemelas			Totales	
Agua	39	0.74	(29)		0.1	(4)		0	(0)		0.85	(33)
EtOH 1%	55	0.67	(37)	-	0.05	(3)	-	0	(0)	-	0.73	(40)
MMS 0.5mM/Agua	50	6.54	(327)		6.36	(318)		0	(0)		12.9	(645)
MMS 0.5 mM/EtOH 1%	55	7.18	(395)	+	6.69	(368)	-	0	(0)	-	13.87	(763)
EtOH 1%	55	0.67	(37)		0.05	(3)		0	(0)		0.73	(40)
RES 2.5 µg/mL	52	0.58	(30)	-	0.1	(5)	-	0	(0)	-	0.67	(35)
RES 10.0 µg/mL	35	0.57	(20)	-	0.03	(1)	-	0	(0)	-	0.6	(21)
RES 40.0 µg/mL	46	0.52	(24)	-	0.07	(3)	-	0	(0)	-	0.59	(27)
MMS 0.5 mM	55	7.18	(395)		6.69	(368)		0	(0)		13.87	(763)
MMS + RES 2.5 µg/mL	55	7.07	(389)	-	7.62	(419)	-	0.02	(1)	-	14.71	(809)
MMS + RES10.0 µg/mL	51	7.02	(358)	-	8.8	(449)	+	0	(0)	-	15.82	(807)
MMS + RES 40.0 µg/mL	52	6.92	(360)	-	7.19	(374)	-	0	(0)	-	14.12	(734)

Diagnostico estadístico de acuerdo a Frei y Würigler (1988) comparados con su testigo correspondiente donde m= factor de multiplicación de riesgo mínimo para asignar un resultado positivo, -, negativo, +, positivo, ($p < 0.05$).

CONTROLES MMS/EtOH Y MMS/AGUA

En la comparación de los testigos disolventes (Agua/EtOH 1%), no se observó diferencias significativas de su actividad genotóxica (tabla 3), mostrando que estos compuestos no difieren en dicha acción, este resultado contrasta de lo reportado por García (2012) quien obtuvo con el ensayo SMART en ala de *D. melanogaster* (Cruza Estándar) un aumento significativo en la genotoxicidad por parte del EtOH 1% en comparación con el agua; dicha diferencia puede deberse a los CYP450s mismos que están aumentados en la CBE y que son capaces de participar en el metabolismo de EtOH, en especial la isoforma Cyp4502E1 la cual favorece su desintegración, aunque, no obstante, esta actividad se ha relacionado con la generación de ROS y con ello su participación en el estrés oxidante, lo cual puede dañar directamente a la célula (Tang *et al.*, 2012).

En cuanto a los controles MMS se observó que existen diferencias significativas en la genotoxicidad entre el MMS disuelto en EtOH 1% y en agua, ya que al ser disuelto en etanol existe un aumento en la frecuencias de manchas totales y pequeñas *mwh*/individuo, ello podría sugerir una acción genotóxica por parte del EtOH (Figuras 5 y 6). Sin embargo, al no existir diferencias significativas entre los testigos disolventes que pudiesen aumentar la genotóxicidad de MMS, se sugiere que esta diferencia en el daño puede ser por la asociación entre EtOH y MMS lo que permite aumentar la polaridad de MMS y con ello facilitar la entrada a través de la membrana celular generando así un mayor daño, estos resultados refuerzan los sugerido por Arcos en 2013, quien obtuvo un resultado similar y menciona dicha observación; aunque, cabe mencionar que el estado redox que produce el EtOH tiene relevancia biológica y contribuye a diferentes patogénesis, ya que los radicales libres generados durante el metabolismo del mismo interactúan con proteínas, lípidos, y DNA formando aductos (Niemela, 1999; Abraham *et al.*, 2002).

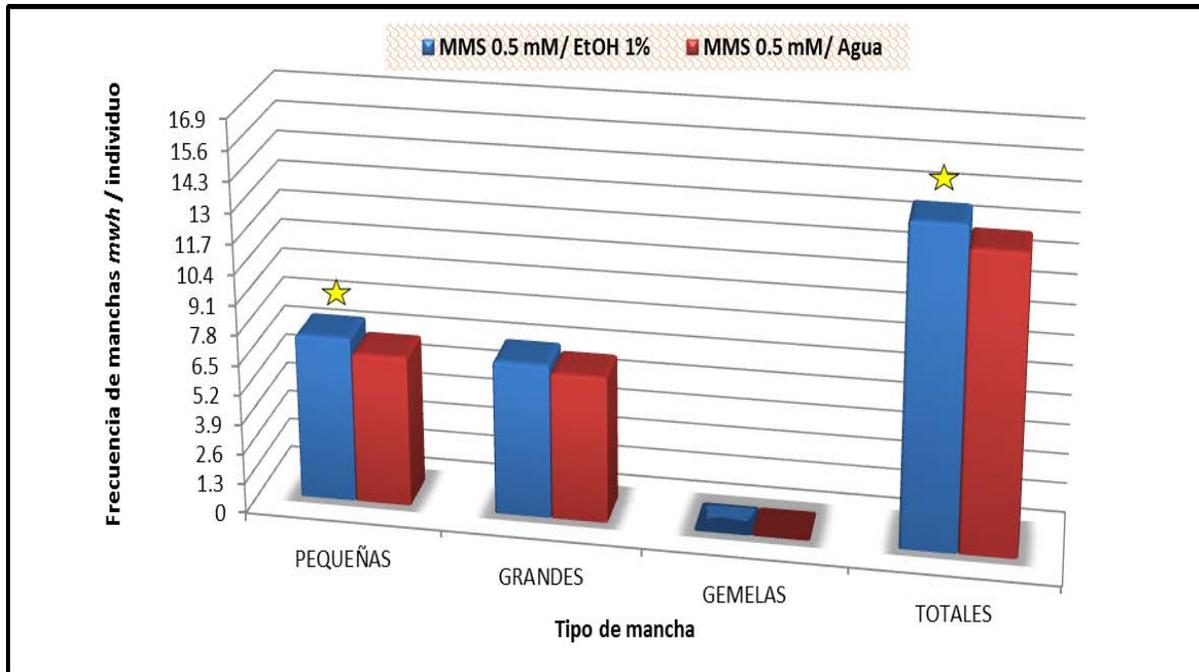


Fig. 5.- Efecto del MMS 0.5 mM, disuelto en EtOH 1% y agua, en la frecuencia de todos los tipos de manchas *mwh*/individuo. Las frecuencias de los clones mutantes representan la pérdida de heterocigosis de los marcadores *mwh + + flr3* en las células de los discos imaginales de las alas, detectadas por medio de SMART en ala. Se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos para manchas totales al analizar los datos con el programa SMART para PC (Frei and Würgler, no publicado) a un nivel de significancia $p < 0.05$. Donde (★) estadísticamente significativo.

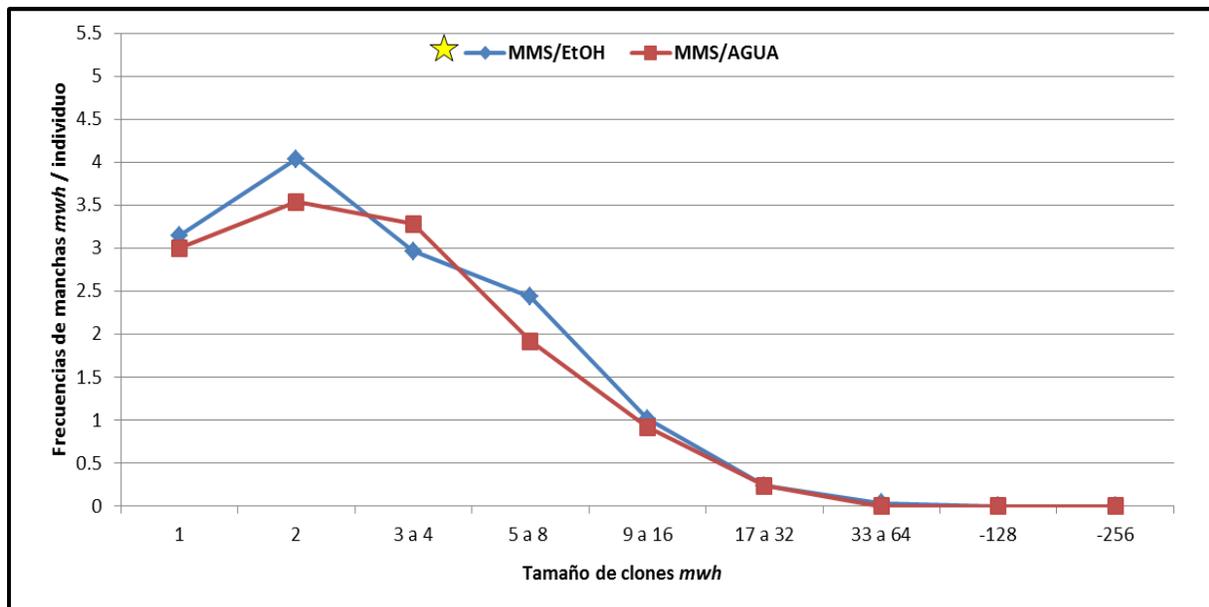


Fig. 6. Frecuencia de manchas por individuo por cada tamaño de clon *mwh* obtenidas después del análisis SMART para los tratamientos MMS 0.5 mM/EtOH 1% y MMS 0.5 mM/agua. Al compararse entre sí, se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos al analizar la distribución de los datos acumulados con la prueba Kolmogorov-Smirnov a un nivel de significancia de $p < 0.05$. Donde (★) estadísticamente significativo.

TESTIGOS RESVERATROL

En la Figura 7 se describe el tipo y frecuencia de manchas *mwh* por individuo con los diferentes tratamientos de RES (2.5, 10 y 40 µg/mL) disuelto en EtOH 1%, y comparados con el mismo disolvente. No existen diferencias significativas entre los tratamientos con RES y el disolvente EtOH 1% indicándonos un efecto nulo de genotoxicidad o modulación de la misma por parte del RES en comparación con el daño que genera EtOH 1%; sin embargo, cabe mencionar; de igual manera en la figura 8 observamos que el tamaño y la frecuencia de los clones *mwh* no se ven modificadas sugiriendo que RES no altera el ciclo celular; todo ello permite deducir que tanto el RES como el EtOH 1% no difieren en su efecto genotóxico en la CBE. Estos resultados contrastan con lo obtenido por García, en 2012, quien al evaluar la actividad del RES, a las mismas concentraciones en la crusa estándar de *D. melanogaster* obtuvo que la concentración 2.5 µg/mL de RES aumenta la genotoxicidad producida por el EtOH 1%, deduciendo que este efecto pudo deberse a una actividad pro-oxidante del RES. Esta diferencia puede explicarse debido a la participación de los CypP450s en el metabolismo del RES dado que en la CBE los citocromos se encuentran elevados, por lo que pudieran haber permitido una mayor eliminación del RES a esta concentración, ya que se sabe que el RES es metabolizado por las isoformas de citocromos CYP1B1 y CYP1A2 (Kim *et al.*, 2009) y en *D. melanogaster* los Cyp450s son análogos a éstos. De igual manera, apoyando los resultados obtenidos en la CBE, en estudios en los que se ha evaluado la actividad genotóxica del RES se muestra que concentraciones menores a 5 µm tienden a disminuir la genotoxicidad de algunos agentes oxidantes tales como: arsenito de sodio (NaAsO₂) esto debido a la actividad antioxidante que presenta RES, así como la posible activación de algunas rutas apoptóticas por parte del mismo (Chen *et al.* 2013), aunque en estos trabajos no se utilizaron células u organismos que tuvieran diferencias en la actividad de los CYP450s.

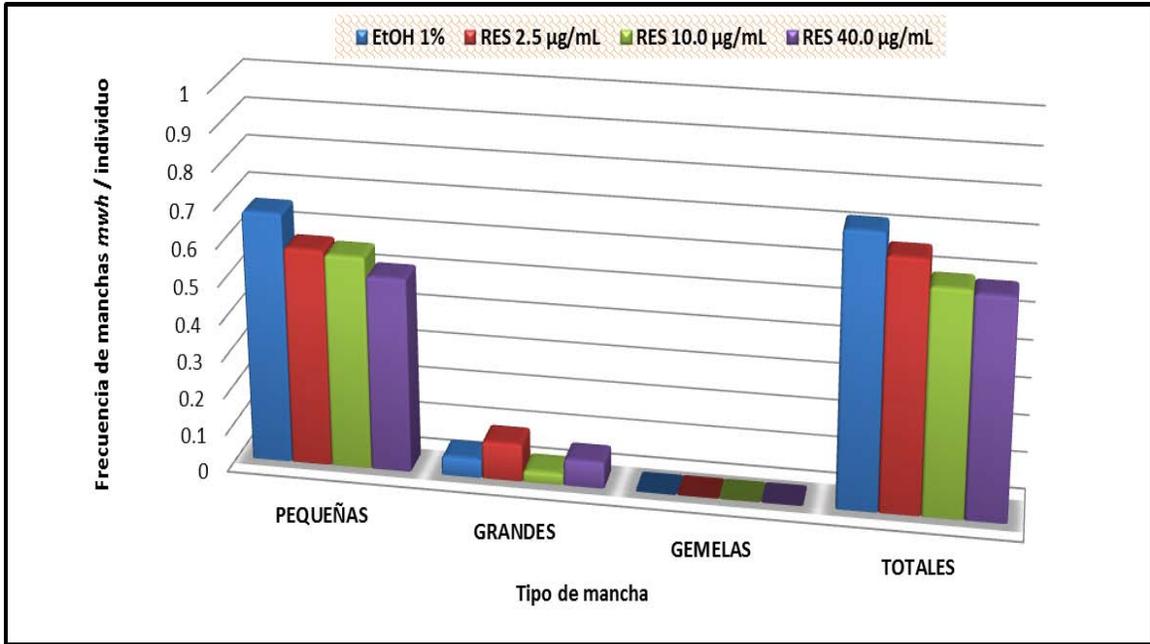


Fig. 7. Efectos del RES en la frecuencia de todos los tipos de manchas *mwh*/individuo. Larvas de 72 ± 4 h fueron alimentadas con RES [2.5, 10, 40 $\mu\text{g/mL}$] y EtOH 1% como testigo disolvente. Las frecuencias de los clones mutantes representan la pérdida de heterocigosis de los marcadores *mwh* +/ + *flr*³ en las células de los discos imaginales de las alas por medio de SMART en ala. No se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos y el disolvente al analizar los datos con el programa SMART para PC (Frei and Würzler, no publicado) a un nivel de significancia de $p < 0.05$.

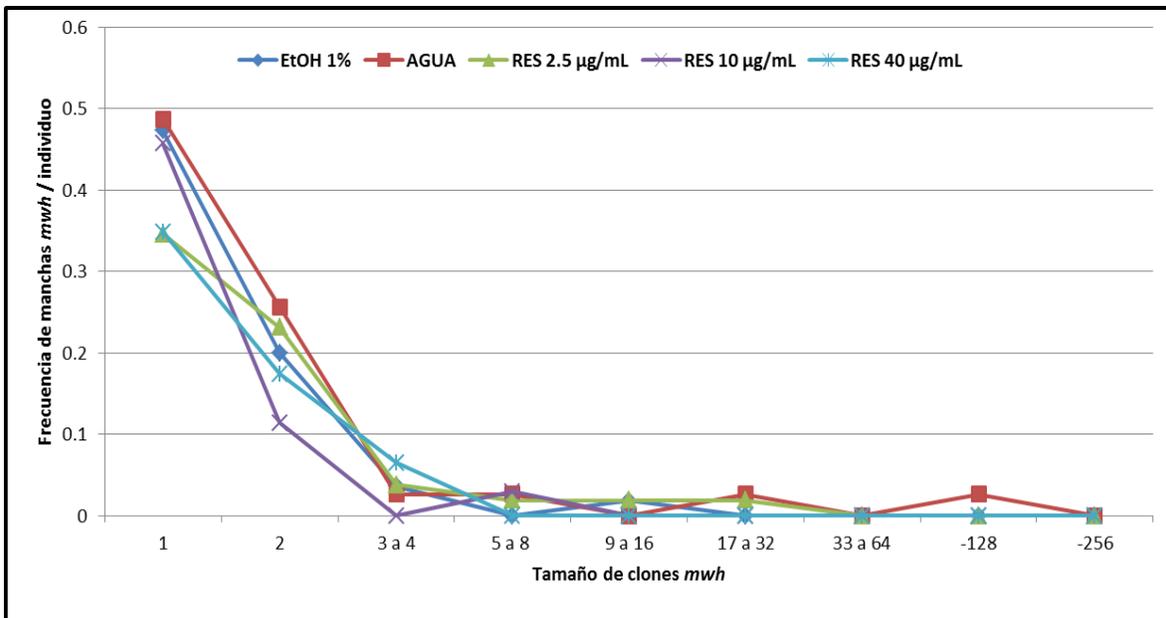


Fig. 8. Distribución de la frecuencia de manchas por individuo por cada tamaño de clon *mwh* obtenidas después del análisis SMART para los tratamientos con RES (2.5, 10 y 40 $\mu\text{g/mL}$) comparados con EtOH 1% como testigo disolvente y agua como testigo negativo. No se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos y el disolvente al analizar la distribución de los datos acumulados con la prueba de Kolmogorov-Smirnov, a un nivel de significancia de $p < 0.05$.

TRATAMIENTOS RES/MMS.

En la Figura 9 se describen las frecuencias y tipos de manchas *mwh* por individuo para los tratamientos de RES (2.5, 10 y 40 $\mu\text{g/mL}$) con MMS (0.5 mM), comparados con el testigo MMS/EtOH; se observa que la frecuencia de manchas pequeñas no presenta diferencias significativas entre los diferentes tratamientos contra el testigo, indicando que RES no tuvo algún efecto modulador con respecto a la genotoxicidad provocada por el MMS; para manchas grandes el RES aumentó la actividad genotóxica a la concentración de 10 $\mu\text{g/mL}$ en comparación con el testigo MMS/EtOH, indicando una posible actividad pro-oxidante de RES, la cual se sumaría a la actividad de MMS generando un aumento en la frecuencia de manchas grandes; estos resultados contrastan con los obtenidos en la cruz CE realizada por García (2012) en donde la actividad genotóxica del MMS no se alteró por el RES al ser subministrado en co-tratamiento.

La CBE presenta niveles altos de Cyp450s y genera más ROS que la CE, los cuales pudieron afectar el efecto de RES. Kim *et al.* (2009) reportaron que este último es metabolizado por ciertas isoformas CYP450s generando metabolitos como el piceaetanol, principalmente, propuso que los cambios en la estructura de RES por parte del metabolismo alteran la actividad que pueda generar ya sea apoptótica, antioxidante, pro-oxidante y citotóxica por mencionar algunas (Schmitt *et al.*, 2002; Matsuoka *et al.*, 2002; Kucinska *et al.*, 2014). Dado que la literatura científica reporta que actividad de RES se ve afectada por el metabolismo y dentro del mismo juegan un papel primordial los Cyp450 se puede proponer que con la concentración de 10 $\mu\text{g/mL}$ se pudo favorecer la actividad pro-oxidante del RES lo cual aumentaría el daño genotóxico que genera MMS, aunque esto tendría que comprobarse con otras técnicas, como la expresión de genes relacionados con el estrés oxidante, tales como *Hsp60*, *Hsp70* y *Hsp80*. Asimismo, se puede relacionar este resultado con la actividad de los Cyp450s y la producción de ROS, por MMS y por esos citocromos, como se ha comentado antes (Zangark *et al.*, 2004) o bien por todas estas actividades actuando en conjunto. Hay que señalar que la actividad genotóxica del RES sólo para manchas grandes indica que el daño ocurrió al principio de la diferenciación celular en los discos imaginales del ala, y al correlacionarlo con la Figura 9 donde a la misma concentración, hay una alteración del ciclo celular evidenciada por los resultados de la prueba de Kolmogorov-Smirnov. En cuanto a las concentraciones de RES 2.5 y 40 $\mu\text{g/mL}$ no se obtuvo efecto del tratamiento RES comparándolo con el tratamiento MMS/EtOH (Figuras 9 y 10). Con base en estos resultados se tiene que con la

concentración más baja de RES (2.5 µg/mL) no se modifica el efecto genotóxico de MMS, al aumentar la concentración a 10 µg/mL se observa un incremento significativo de la genotoxicidad del MMS, con la concentración 40 µg/mL no hubo diferencia significativa con respecto al testigo MMS/EtOH, por lo cual no hay una respuesta dependiente de la concentración. Chen *et al.* (2013) explican este efecto de RES en la toxicidad inducida por el arsenito de sodio (NaAsO₂). Esto se ve reforzado por el estudio que realizaron Mitrut *et al.* (2009), quienes al probar la genotoxicidad de RES con el ensayo de MN notaron que las frecuencias de los mismos aumenta conforme se aumenta la cantidad de RES; de igual manera RES puede incrementar la actividad de las caspasas 3 y 9, y provocar muerte celular relacionada a un bajo potencial mitocondrial, aumento del estrés oxidante y la disminución de niveles de algunas enzimas antioxidantes y detener el ciclo celular en la fase G1, relacionando su actividad pro-oxidante con su efecto citotóxico (Schmitt *et al.*, 2002; Kucinska *et al.*, 2014) por lo que sería adecuado comprobar esto con algunas técnicas moleculares, como ya se ha mencionado arriba.

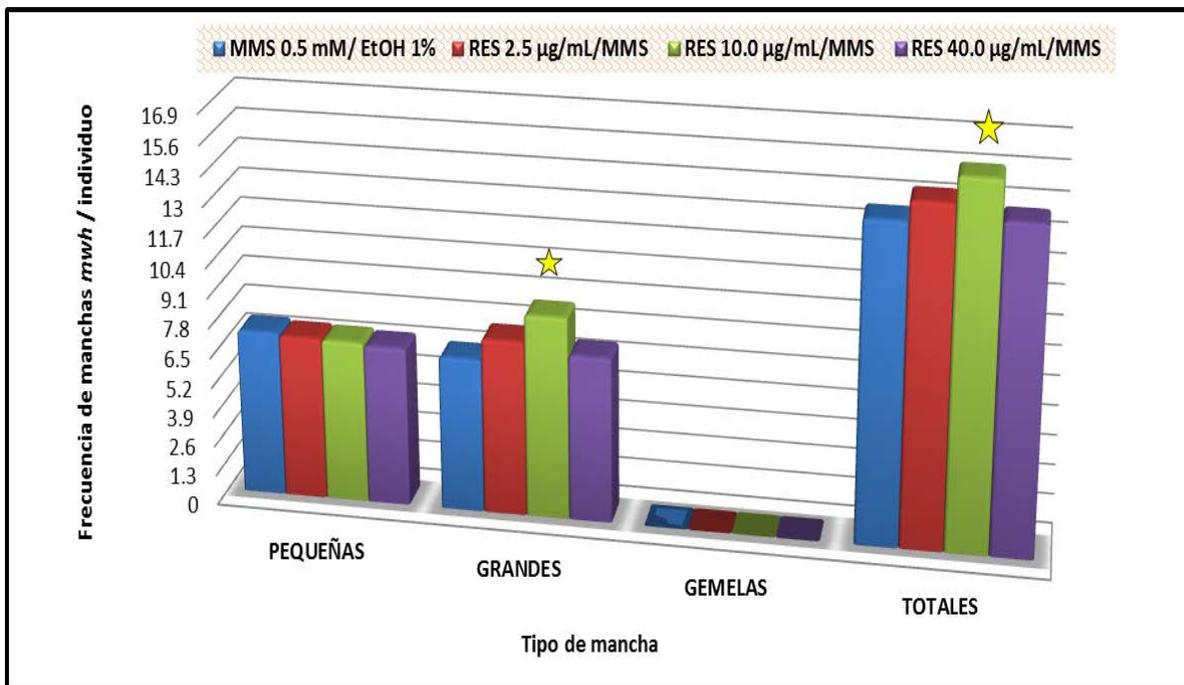


Fig. 9. Efectos del RES/MMS en la frecuencia de todos los tipos de manchas *mwh*/individuo. Larvas de 72 ±4 h fueron alimentadas con RES [2.5, 10, 40 µg/mL] en co-tratamiento con MMS 0.5 mM y MMS/EtOH 1% como testigo. Las frecuencias de los clones mutantes representan la pérdida de heterocigosis de los marcadores *mwh +/+ flr3* en las células de los discos imaginales de las alas por medio de SMART en ala. Se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos a la concentración 10 µg/mL para manchas grandes y totales al analizar los datos con el programa SMART para PC (Frei and Würigler, no publicado) a un nivel de significancia $p < 0.05$. Donde (★) estadísticamente significativo.

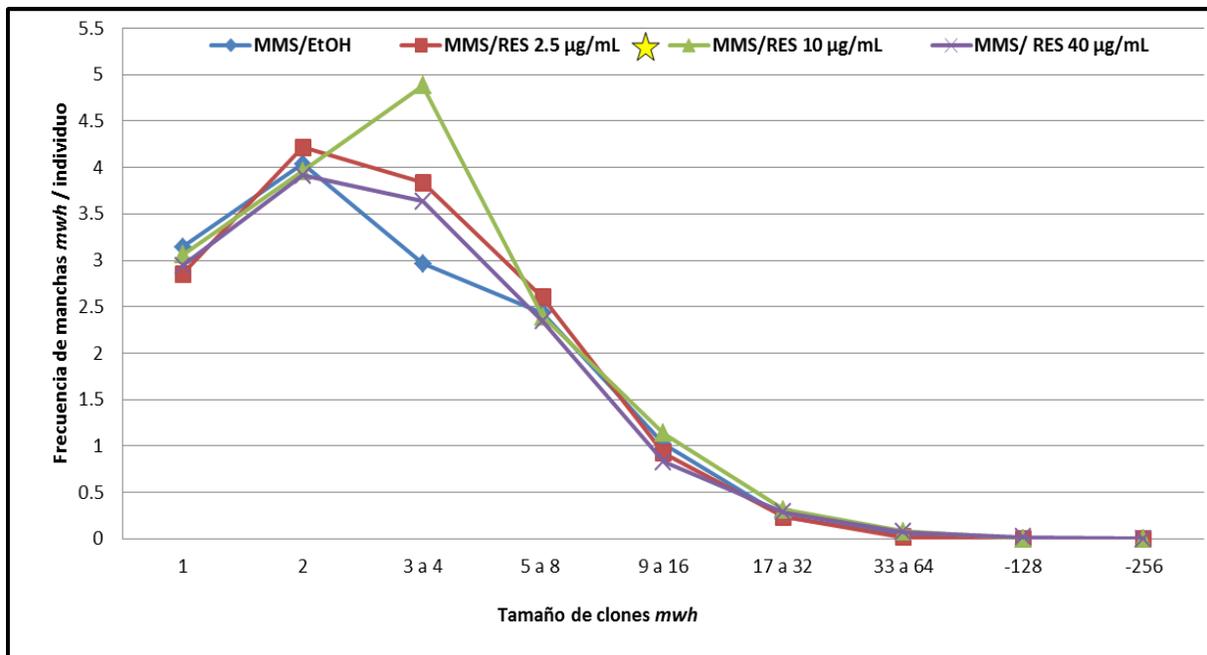


Fig. 10. Frecuencia de manchas por individuo por cada tamaño de clon *mwh* obtenidas después del análisis SMART para los tratamientos con RES (2.5, 10 y 40 µg/mL) en co-tratamiento con MMS 0.5 mM comparados con MMS/ EtOH 1% como testigo. Se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos y el testigo a una concentración de 10 µg/mL al analizar la distribución de los datos acumulados con la prueba Kolmogorov-Smirnov, a un nivel de significancia $p < 0.05$. Donde (★) estadísticamente significativo.

CONCLUSIONES

- El MMS causó un daño genotóxico significativo al disolverlo con EtOH 1% y compararlo con el MMS disuelto en agua miliQ.
- Los tratamientos con el RES no aumentaron ni disminuyeron la frecuencia de ningún tipo de manchas, ni la distribución de clones *mwh* obtenidas con el disolvente y testigo EtOH 1%.
- El co-tratamiento RES a la concentración 10 µg/mL aumentó significativamente el daño producido por el MMS en la CBE de la prueba SMART en ala de *D. melanogaster*, dado el aumento en la frecuencia de manchas grandes y totales por individuo.
- Para el co-tratamiento RES/MMS 10 µg/mL se sugiere que existe una modificación de la división celular de los discos imaginales del ala de *D. melanogaster* al mostrar diferencia significativa en la distribución del tamaño de clones *mwh*.

Referencias

Abraham P., Wilfred G., Ramakrishna B. 2002. Oxidative damage to the hepatocellular proteins after chronic ethanol intake in the rat. *Clin.Chim. Acta.* **325**: 117–125.

Adams M.D., Celniker S.E., Holt R.A., Evans C.A., Gocayne J.D., et al. 2000. The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science* **287**: 2185-2195.

Aggarwal B.B., Bhardwaj A., Aggarwal R. S., Seeram N. P., Shishodia S., Takada Y. 2004. Role of resveratrol in prevention and therapy of cancer: preclinical and clinical studies. *Anticancer Res.* **24**: 2783-2840.

Ahmad A., Syed F.A., Singh, S., Hadi, S.M. 2005. Prooxidant activity of resveratrol in the presence of copper ions: mutagenicity in plasmid DNA. *Toxicol.Lett.* **159**: 1-12.

Ahmad K.A., Clement M.V., Pervaiz S. 2003. Pro-oxidant activity of low doses of resveratrol inhibits hydrogen peroxide-induced apoptosis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1010**: 365-373.

Arcos T.L.B. 2013. Evaluacion del efecto del licopeno sobre metil metanosulfonato y peroxido de hidrogeno en SMART en ala de *D. melanogaster* (CBE). Tesis de licenciatura (Biología). UNAM. FES Iztacala. Mexico. 57 p.

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

Baur J.A., Sinclair D.A. 2006. Therapeutic potential of resveratrol: the *in vivo* evidence. *Nat. Rev. Drug. Discov.* **5**: 493-506.

Calabrese E.J., Mattson M.P., Calabrese V. 2010. Resveratrol common displays hormesis: occurrence and biomedical significance. *Human Exp. Toxicol.* **29**: 980-1015.

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

Chen C., Jiang X, Zhao W, Zhang Z. Z. 2013. Dual role of resveratrol in modulation of genotoxicity induced by sodium arsenite via oxidative stress and apoptosis. *Food Chem.Toxicol.* **59**: 8-17.

Chen Z., Hurh Y.J., Na H.K., Kim J.H., Chun Y.J., Kim D.H., Kang K.S., Cho M.H., Surh Y.J. 2004. Resveratrol inhibits TCDD-induced expression of CYP1A1 and CYP1B1 and catechol estrogen-mediated oxidative DNA damage in cultured human mammary epithelial cells. *Carcinogenesis* 25: 2005-2013.

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

De la Lastra C.A., Villegas I. 2007. Resveratrol as an antioxidant and pro-oxidant agent: mechanisms and clinical implications. *Biochem. Soc. Trans.* **35**: 1156-1160.

Drosophila Genetics and Epigenetics. [En línea] 12 de Noviembre del 2014 [Fecha de acceso 17 de Noviembre del 2014], disponible en: <http://184.73.223.226/GEDlab/>

Dueñas I.E., Heres. M.E., Castañeda. P.L. y Graf. U. 2002. Easy raising of *Drosophila melanogaster* on a medium consisting of mashed potato flakes and a preservative solution. *DIS*. **84**: 166.

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

García H.E. 2012. Evaluación del potencial antigenotóxico del resveratrol en co-tratamiento con MMS, en el bioensayo SMART en ala de *Drosophila melanogaster* (cruza estándar). Tesis de licenciatura (Biología). UNAM. FES Iztacala. México. 62 p.

Guengerich F.P. 1993. Cytochrome P450 enzymes. *Am. Sci.* **81**: 440-447.

Guerrero S. J., Valle B. M., Aguirre E. J. 2005. La respuesta SOS en *Escherichiacoli*. *Rev. Esp. Cien. Químico-Biológicas.* **8**: 99-105.

Graf U., van Schaik, N. 1992. Improved high bioactivation cross for the wing somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Mutat. Res.* **271**: 59-67.

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

Hancock J.T., Desikan R., Neill S.J. 2001. Role of reactive oxygen species in cell signaling pathways. *Biochem. Soc. Trans.* **29**: 345-350.

Jackson H. 1964. The effects of alkylating agents on fertility. *Br. Med. Bull.* **20**: 107-114.

Jang J H., Surh Y.J. 2001. Protective effects of resveratrol on hydrogen peroxide-induced apoptosis in rat pheochromocytoma (PC12) cells. *Mutat. Res.* **496**: 181–190.

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

Kai L. Samuel S.K., Levenson AS. 2010. Resveratrol enhances p53 acetylation and apoptosis in prostate cancer by inhibiting MTA1/NuRD complex. *Int. J. Cancer* **126**: 1538–1548.

Kim D.H., Ahn T., Jung H.C., Pan J.G. Yun C.H. 2009. Generation of the human metabolite piceatannol from the anticancer-preventive agent resveratrol by bacterial cytochrome P450 BM3. *Drug Metab.Dispos.* **37**: 932-936.

Kucinska M., Piotrowska H., Luczak M.W., Pietrasik J.M., Ksiazek K., Wozniak M., Wierzchowski M., Dudka J., Jäger W., Murias M. 2014. Effects of hydroxylated resveratrol analogs on oxidative stress and cancer cell death in human acute T cell leukemia cell line: prooxidative potential of hydroxylated resveratrol analogs. *Chem. Biol. Interact.* **209**: 96-110.

Leclerc J., Courcot-Ngoubo Ngangue E., Cauffiez C., Allorge D., Pottier N., Lafitte J.J., Debaert M., Jaillard S., Broly F., Lo-Guidice J.M. 2011. Xenobiotic metabolism and disposition in human lung: transcript profiling in non-tumoral and tumoral tissues. *Biochimie.* **93**: 1012-1027.

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

Li Y.G., Zhu W., Tao J.P., Xin P., Liu M.Y., Wei M. 2013. Resveratrol protects cardiomyocytes from oxidative stress through SIRT1 and mitochondrial biogenesis signaling pathways. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **438**: 270-276.

Lu L., Zhu S., Zhang H., Zhang S. 2013. Improvement of antioxidative activity of resveratrol by elongating conjugated chain: A DFT theoretical study. *Computational and Theoretical Chemistry* **1019**: 39–47.

Matsuoka A., Takeshita K., Furuta A., Ozaki M., Fukuhara K., Miyata N. 2002. The 4'-hydroxy group is responsible for the *in vitro* cytogenetic activity of resveratrol. *Mutat. Res.* **521**: 29-35.

Miura T., Muraoka S., Ikeda N., Watanabe M., Fujimoto Y. 2000. Antioxidative and prooxidative action of stilbene derivatives. *Pharmacol. Toxicol.* **86**: 203–208.

Mitrut P., Burada F., Enescu A., Scorei R., Badea D., Genunche-Dumitrescu A., Rogoz I., Manea M. 2009. The genotoxicity study of resveratrol in primary gastric adenocarcinoma cell cultures. *Rom. J. Morphol. Embryol.* **50**: 429-433.

Mohammadi-Bardbori A., Bengtsson J., Rannug U., Rannug A., Wincent E. 2012. Quercetin, resveratrol, and curcumin are indirect activators of the aryl hydrocarbon receptor (AHR). *Chem. Res. Toxicol.* **25**: 1878–1884.

Morse M.A., Stoner G.D. 1993. Cancer chemoprevention: principles and prospects. *Carcinogenesis*. **14**: 1737–1746.

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

Niemelä O. 1999. Aldehyde–protein adducts in the liver as a result of ethanol-induced oxidative stress. *Front. Biosci.* **4**: 506–513.

NCBI. 2014. [En línea] 20 noviembre 2014 [Fecha de acceso: 20 de noviembre de 2014]
Accesible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/?term=drosophila+melanogaster>

OMIM. 2014. [En línea] 19 de septiembre de 2014 [Fecha de acceso: 20 de noviembre de 2014]
Accesible en: http://omim.org/search?index=entry&sort=score+desc%2C+prefix_sort+desc&start=1&limit=10&search=drosophila+homologs

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

Paul H., 2010. An Introduction to Reactive Oxygen Species Measurement of ROS in Cells. *BioTek Instruments Inc.* **10**: 1-13.

Piotrowska H., Kucinska M., Murias M. 2010. Biological activity of piceatannol: leaving the shadow of resveratrol. *Mutat. Res.* **750**: 60-82.

Piver, B. Fer M, Vitrac X, Merillon JM, Dreano Y, Berthou F, Lucas D 2004. Involvement of cytochrome P450 1A2 in the biotransformation of trans-resveratrol in human liver microsomes. *Biochem. Pharmacol.* **68**: 773–782.

Potter G.A., Patterson L.H., Wanogho E., Perry P.J., Butler P.C., Ijaz T., Ruparelia K.C., Lamb J.H., Farmer P.B., Stanley L.A., Burke M.D. 2002. The cancer preventative agent resveratrol is converted to the anticancer agent piceatannol by the cytochrome P450 enzyme CYP1B1. *Br. J. Cancer* **86**: 774–778.

Reiter L.T., Potocki L., Chien S., Gribskov M. Bier E. 2001. A systematic analysis of human disease-associated gene sequences in *Drosophila melanogaster*. *Genome Res.***11**: 1114–1125.

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

Rubin G.M. 2000. Comparative genomics of the eukaryotes. *Science.***287**: 2204–2215.

Safe S., Wargovich M.J., Lamartiniere C.A., Mukhtar H. 1999. Symposium on mechanisms of action of naturally occurring anticarcinogens. *Toxicol. Sci.* **52**: 1–8.

Schmitt E., Lehmann L., Metzler M., Stopper H. 2002. Hormonal and genotoxic activity of resveratrol. *Toxicol. Lett.* **136**: 133-142.

Stakleff K.S., Sloan T., Blanco D., Marcanthony S., Booth T.D., Bishayee A. 2012. Resveratrol exerts differential effects *in vitro* and *in vivo* against ovarian cancer cell. *Asian Pac. J. Cancer Prev.* **13**: 1333-1340.

Steenwyk C.R., Tan B. 2010. *In vitro* evidence for the formation of reactive intermediates of resveratrol in human liver microsomes. *Xenobiotica*. **40**: 62-71.

Szekeres T., Fritzer-Szekeres M., Saiko P., Jäger W. 2010. Resveratrol and resveratrol-analogues structure activity relationship. *Pharm. Res.* **27**: 1042-1048.

Tang Q., Li G., Wei X., Zhang J., Chiu J.F., Hasenmayer D., Zhang D., Zhang H. 2013. Resveratrol-induced apoptosis is enhanced by inhibition of autophagy in esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Lett.* **336**: 325–337.

Tang Y., Gao C., Shi Y., Zhu L., Hu X., Wang D., Lu Y., Yang X., Liu L., Yao P. 2012. Quercetin attenuates ethanol-derived microsomal oxidative stress: implication of haem oxygenase-1 induction. *Food Chem.* **132**: 1769–1774.

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

Vázquez C.B., Bautista P.M.R., Segura C.D., Barral C.J.A. 2008. Farmacología general, Principios básicos. Editorial UNAM FES-I. Primera edición. pp. 71-83.

Wyatt M.D., Pittman D.L. 2006. Methylating agents and DNA repair responses: Methylated bases and sources of strand breaks. *Chem. Res. Toxicol.* **19**: 1580-1594.

Wilhelm D., Bender K., Knebel A., Angel P. 1997. The level of intracellular glutathione is a key regulator for the induction of stress-activated signal transduction pathways including Jun N-terminal protein kinases and p38 kinase by alkylating agents. *Mol. Cell Biol.* **17**: 4792-4800.

Zangar R.C., Davydov D.R., Verma S. 2004. Mechanisms that regulate production of reactive oxygen species by cytochrome P450. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **199**: 316–331.

Zhang J., Chiu J.F., Zhang H., Qui T., Tang Q., Ma K., Lu H., Li G. 2013. Autophagic cell death induced by resveratrol depends on the Ca²⁺/AMPK/mTOR pathway in A549 cells. *Biochem. Pharm.* **86**: 317-329.

Zhou,S. Yung C. S, Cher Goh B, Chan E, Duan W, Huang M, McLeod HL. 2005. Mechanism-based inhibition of cytochrome P450 3A4 by therapeutic drugs. *Clin. Pharmacokinet.* **44**: 279–304.

Anexo 1

Drosophila melanogaster

El uso del díptero *Drosophila melanogaster* en las ciencias biológicas es muy amplia y abarca más de 100 años. Hay muchas características destacadas en este organismo que lo hacen un modelo para el estudio de diversos padecimientos humanos; el genoma de la mosca ha sido completamente secuenciado y reportado (Adams *et al.*, 2000) y codifica para 17,215 genes en cuatro cromosomas, de los cuales tres llevan la mayor parte del genoma (NCBI, 2014). Se han determinado en *D. melanogaster* 177 genes ortólogos de 289 genes humanos que producen enfermedades (61.24%) (Rubin *et al.*, 2000). Además, de 714 genes humanos que codifican enfermedades, se encontraron 548 secuencias únicas en *Drosophila* que son complementarias (77%) (Reiter *et al.*, 2001). Se han comparado los genes de enfermedades humanas que están compilados en el sitio *Online Mendelian Inheritance in Man* (OMIM) con el genoma completo de *Drosophila* con el propósito de construir el sitio <http://homophila.sdsc.edu> en el que se puede recabar información al respecto. Dicho análisis, había mostrado, en el año 2002, que de 911 *loci* humanos de enfermedades 666 *loci* de *Drosophila* eran complementarios (73.1%) con un BLASTE-value de 1×10^{-10} o menos (Chien *et al.*, 2002). La identidad global a nivel de nucleótidos o secuencia de proteínas entre la mosca y los mamíferos es aproximadamente 40% de homólogos, sin embargo, para los dominios funcionales puede ser de 80 a 90% (Pandey, 2011). Por otro lado, el ciclo de vida de la mosca es rápido, ya que tan solo un par de organismos pueden producir cientos de descendientes en 10 a 12 días a 25 C° (Figura 12). El estudio de los mecanismos moleculares y genéticos que subyacen en el procesos de desarrollo de los discos imaginales de la pupa han proporcionado información acerca de su biología y para valorar algunos procesos de la biología humana (Pandey, 2011).

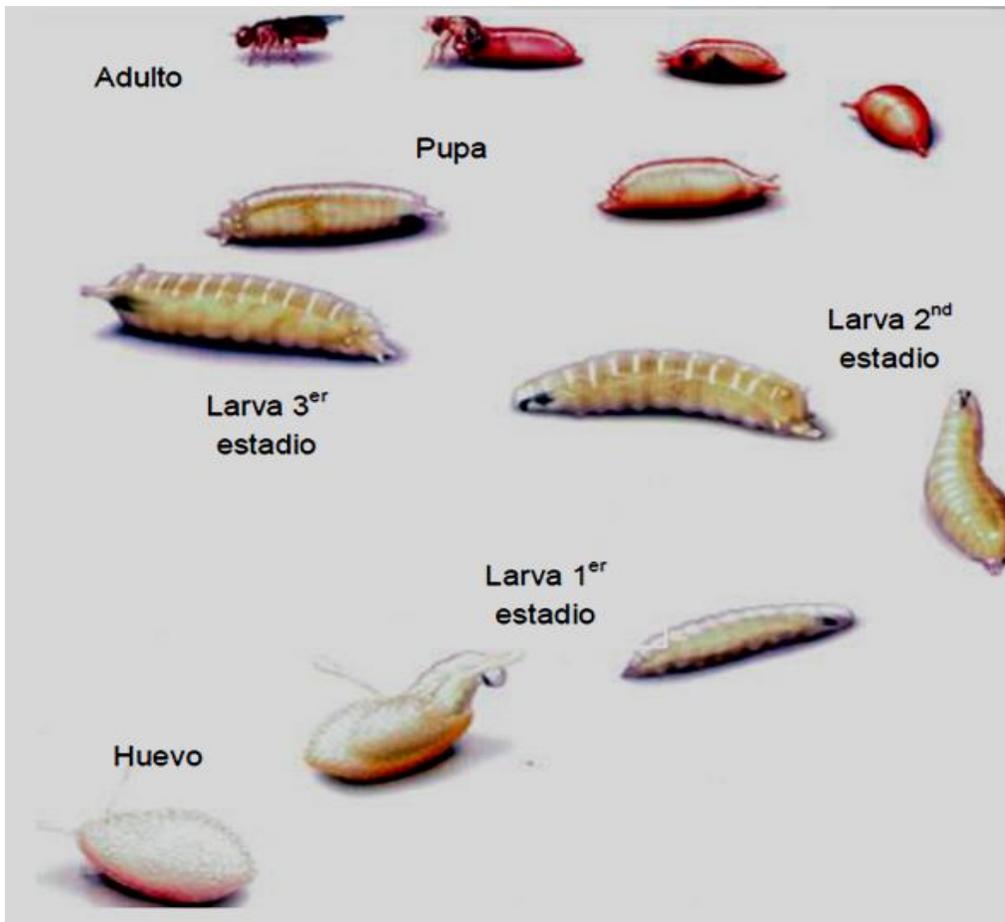


Fig. 11.- Ciclo de vida de *Drosophila melanogaster*. (Tomado de *Drosophila Genetics and Epigenetics*, 2014).

Anexo 2

Eventos que generan pérdida de heterocigosis

El fundamento de la prueba SMART en ala de *D. melanogaster* se basa en la pérdida de heterocigosis de genes marcadores, provocada por el tratamiento con agentes genotóxicos que producen daño a las células de los discos imaginales de las larvas llevando a la formación de clones de células mutadas que se expresan como manchas en las alas, permitiendo medir eventos de genotoxicidad por parte del compuesto tales como: mutación, delección, aneuploidía y recombinación somática (Graf *et al.*, 1984).

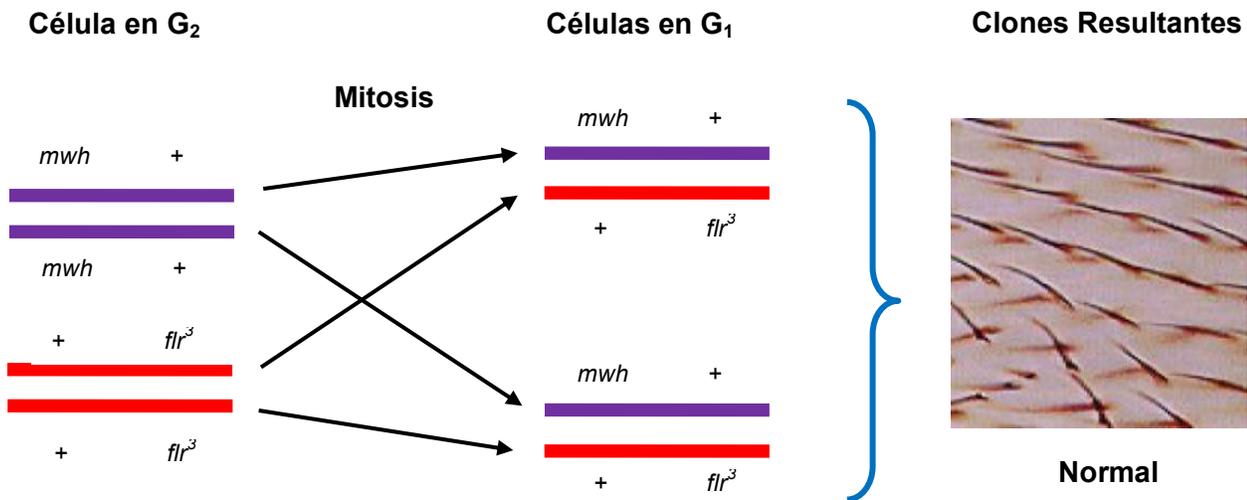


Fig. 12. Eventos genéticos que generan la pérdida de heterocigosis de los marcadores *flr³* y *mwh* y su expresión fenotípica.

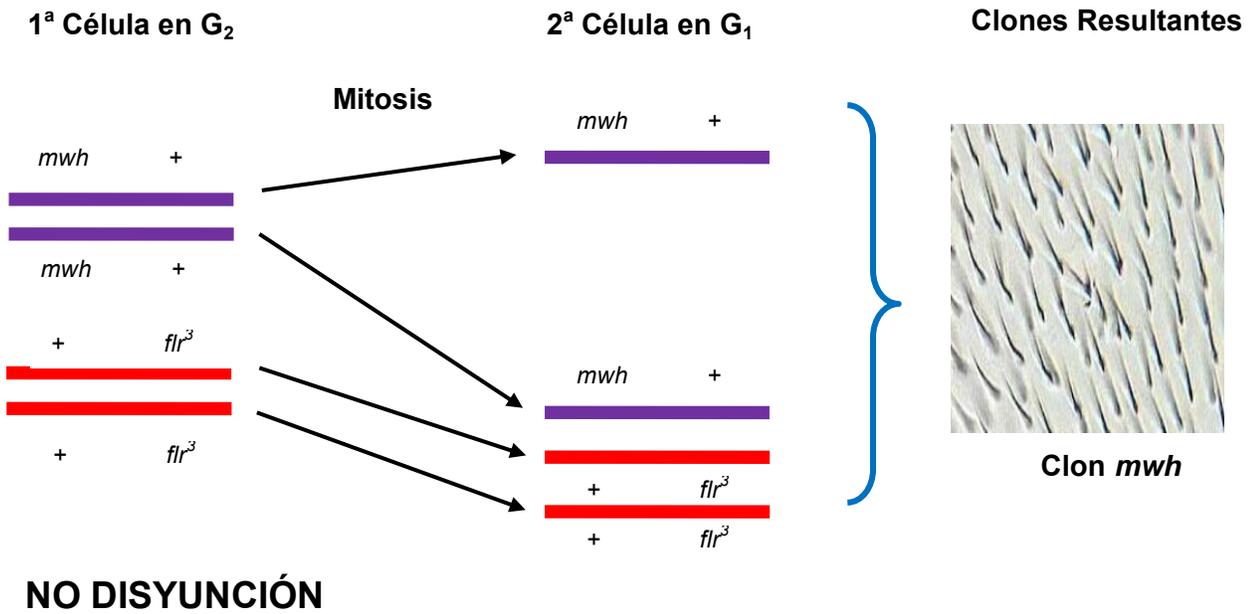


Fig. 12 (Continuación). Eventos genéticos que generan la pérdida de heterocigosis de los marcadores *flr³* y *mwh* y su expresión fenotípica.

