



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

Evaluación del efecto de la Vitamina C, Nicotina y DMSO en la longevidad de *Drosophila melanogaster* (Díptera, Drosophilidae).

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:

LICEA HERRERA JESSICA ITZAYANA

Cuautitlán Izcalli, Estado de México, 2016



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.

**DIRECTORA DE TESIS:
M. en C. Irma Elena Dueñas García
2016**



CONTENIDO

Resumen	5
Introducción	6
Vitamina C	7
Nicotina	10
DMSO (Dimetilsulfóxido).....	11
Modelo biológico <i>Drosophila melanogaster</i>	13
Antecedentes	16
Vitamina C	17
Tabla 1. Efecto de la Vitamina C sobre la longevidadde roedores, nemátodos y moscas	17
Tabla 2. Efecto pro-oxidante de la Vitamina C en los modelos biológicos de ratones, nemátodos y moscas.....	18
Tabla 3. Sin ningún efecto al usar Vitamina C en roedores y <i>C. elegans</i>	20
Nicotina	21
Tabla 4: Efecto de la nicotina en <i>d. melanogaster</i> y roedores.....	21
Dimetilsulfóxido (DMSO).....	23
Tabla 5: Efecto del Dimetilsulfóxido en <i>D. melanogaster</i> y cultivos celulares.....	24
Justificación	26
Objetivos	26
General.....	27
Particulares.....	27
Hipótesis	27
Materiales	28
Químicos.....	28
Biológicos	29
Métodos	29
Propagación y colecta de huevos.....	29
Sincronización de edades.....	29
Experimentación	29
Registro de datos	30
Análisis estadístico	30
Resultados y discusión	31
Vitamina C	31
Figura 8.....	32
Figura 9.....	33

Tabla 6: <i>Análisis de comparación entre el tiempo de vida de las moscas expuestas a Vitamina C y Agua.</i>	¡Error! Marcador no definido.
Tabla 7: Análisis de comparación entre las concentraciones de Vitamina C utilizadas para cada sexo (paquete minitab17). a que parametro corresponden los datos?	34
Tabla 8: Análisis de comparación de pendientes entre machos y hembras de cada tratamiento de vitamina C utilizado (paquete minitab17). lo mismo.	34
NICOTINA.....	37
Figura 10.....	38
Figura 11.....	39
Tabla 9: Análisis de comparación entre los tratamientos Nicotina Vs. agua	39
Tabla 10: Análisis de comparación entre las concentraciones de Nicotina para cada sexo usando la prueba estadística de t para pendientes (paquete minitab17).....	40
Tabla 11: Análisis de comparación de pendientes entre machos y hembras de cada tratamiento de nicotina utilizado (paquete minitab17).....	40
Dimetilsulfóxido (DMSO).....	43
Figura 12.....	44
Figura 13.....	44
Tabla 12: Análisis de comparación entre los tratamientos de DMSO Vs. agua	45
Tabla 13: Análisis de comparación entre las concentraciones de DMSO para cada sexo usando la prueba estadística de t para pendientes (paquete minitab17)	45
Tabla 14: Análisis de comparación de pendientes entre machos y hembras de cada concentración de DMSO usanda (paquete minitab17).....	45
Conclusiones	47
Bibliografía	47

RESUMEN

El envejecimiento implica el daño gradual de las células producido por especies químicas radicales derivadas del oxígeno (ROS). El aumento de ROS, ocasiona cambios degenerativos y pérdida neuronal. Por otra parte, los antioxidantes ayudan a contrarrestar ese efecto (Tal es el caso de la vitamina C). Por otro lado algunos compuestos promueven el incremento de ROS; la nicotina del tabaco incrementa las ROS y por tanto podría intervenir en el envejecimiento y disminución del tiempo de vida. El dimetilsulfóxido (DMSO), es utilizado como disolvente de sustancias insolubles en agua, y empleado en estudios con organismos vivos; Sin embargo, existen reportes que sugieren posee efecto nocivo. *D. melanogaster* permite realizar estudios biológicos de corto plazo dado su ciclo de vida corto y manutención de bajo costo. El objetivo del trabajo fue evaluar el efecto de varias concentraciones de nicotina, vitamina C y DMSO sobre la longevidad de *D. melanogaster*. Para lo cual se registró el número de moscas vivas de todos los tratamientos (de cada sexo) cada 2 días durante el cambio de alimento. Los resultados mostraron que vitamina C [20 mM] disminuye en un 92.3%, el tiempo de vida de *D. melanogaster* respecto al control en ambos sexos, y que a las concentraciones 2 y 0.2 mM lo acortan 84.6% y 30.7%, respectivamente, solo en machos, mientras que en hembras ambas concentraciones acortaron 36.3% el tiempo de vida. Por su parte, las 3 concentraciones de DMSO (0.6, 0.3 y 0.15%) acortaron la vida de las moscas en una relación directa. El efecto de la nicotina fue diverso; la concentración 0.62 mM acortó 46.1% y 27.2% la vida de machos y hembras, respectivamente. Nicotina 0.08 mM acortó la vida de los machos 61.54% mientras que, en hembras no mostraron diferencias significativas con respecto al control. Así pues, se encontraron respuestas diferenciadas entre sexos, indicando que las hembras son menos sensibles a los tratamientos. Finalmente, los resultados abren la posibilidad de estudios futuros en los que incluyan la medición de factores moleculares o marcadores genéticos que puedan aproximarnos a los procesos involucrados en estas respuestas.

Palabras clave: Longevidad, envejecimiento, vitamina C, nicotina, DMSO.

INTRODUCCIÓN

Los términos esperanza de vida y longevidad a menudo se consideran como sinónimos aun cuando, en sentido estricto son diferentes; el primero hace referencia al número medio de años que una persona puede vivir según las tasas de mortalidad por edad -del momento- de la población; y el segundo a tener una larga vida, es decir, cuando se ha sobrepasado la esperanza de vida se le llama a esa persona longeva (Everitt y Palmer, 2011). El envejecimiento está relacionado con la longevidad, siendo este un proceso paulatino y gradual de deterioro de la capacidad funcional del organismo que a la larga conducen a la muerte, afectando a todos los niveles de organización biológica (Allevato y Gaviria, 2008). Ambos fenómenos están íntimamente relacionados, de manera que analizando los procesos involucrados en el envejecimiento podríamos explicar cómo intervienen en la modificación de la longevidad (Allevato y Gaviria, 2008).

Las causas del envejecimiento son desconocidas, sin embargo se han postulado varias teorías, entre las más citadas están: i) la teoría del error catastrófico de Orgel, 1963 la cual postula que con la edad se dan errores en la síntesis de proteínas, que determinan la función celular. Sin embargo, este postulado tiene poco sustento, ya que no hay evidencias científicas de que estos errores se acumulen con el tiempo, ii) la teoría del entrecruzamiento (Brownlee, 1991), considera que el entrecruzamiento químico entre proteínas y otras macromoléculas determina el envejecimiento y enfermedades asociadas con la edad, por ejemplo, se sabe que el desarrollo de “cataratas” es consecuencia de la glucosilación y entrecruzamiento de las proteínas del cristalino provocando su opacidad progresiva, sin embargo esta teoría no explica todos los fenómenos relacionados con el envejecimiento, iii) La teoría del desgaste (Sheldrake, 1974), propone que los organismo se componen de partes irremplazables, y que la acumulación de daños en los componentes celulares conducen a la muerte de células, tejidos, órganos y finalmente del organismo (Rocha, 2013); Sin embargo los mismos autores sugieren precaución al respecto dado que la capacidad de reparación del DNA correlaciona positivamente con la longevidad, iv) la teoría del estrés oxidante, considerada la más aceptada (Harman, 1956), propone que el envejecimiento se produce por la presencia de radicales libres producidos por el metabolismo aerobio, el cual, además de cumplir el propósito fundamental de permitir la síntesis de ATP, produce de manera secundaria especies reactivas derivadas del oxígeno (ROS) que ocasionan daño gradual a las macromoléculas y que conducen a la muerte celular (Rodríguez y Céspedes, 1999).

Los radicales libres son moléculas o átomos que contienen uno o más electrones no apareados y que pueden existir en forma independiente. Una vez que el radical libre ha conseguido sustraer el electrón que necesita, la molécula que cedió el electrón se convierte a su vez en un radical libre iniciando una reacción en cadena que puede destruir a las células (Avello y Suwalsky, 2006).

La teoría del estrés oxidante establece que el aumento de las ROS, ocasiona cambios degenerativos en las células conduciendo a la senescencia (Rodríguez y Céspedes, 1999). El estrés oxidante se define como el desequilibrio entre las moléculas de alto potencial oxidante derivadas del oxígeno y las antioxidantes, que son sustancias, naturales o artificiales, con capacidad para neutralizar a los radicales libres y proteger a un sistema biológico (Cano y Arnao, 2004).

Las células pueden generar antioxidantes (endógenos), como la superóxido dismutasa, catalasa, glutatión peroxidasa, glutatión reductasa, glutatión, co-enzima Q10 entre otras (Camps, 2010), o bien pueden ser obtenidas a partir de ciertos alimentos como frutas y verduras, tal es el caso de las vitaminas E y C (Halliwell y Gutteridge, 1998; Dabrowska y Moya, 2009).

VITAMINA C

El ácido L-ascórbico (Vitamina C) ($C_6H_8O_6$) es una molécula orgánica tipo ceto-lactona de 6 carbonos (hexosa), con características ácidas. Es hidrosoluble y esencial para la biosíntesis de colágeno, carnitina, neurotransmisores y péptidos neuroendocrinos, así como el control de la angiogénesis (Besabe, 2000).

Las plantas y muchas especies animales sintetizan vitamina C, sin embargo, los primates, murciélagos frugívoros y conejillos de Indias no lo pueden hacer, por lo que es indispensable que la obtengan de la dieta. Estos animales carecen de la enzima L-gulono-1-Lactona-oxidasa (GULO), la cual se encarga de sintetizar el 2-Ceto-1-gulolactona, que es el precursor inmediato del ácido ascórbico.

En humanos, la deficiencia de esta vitamina es conocida como “escorbuto” y se caracteriza clínicamente por fragilidad capilar, diátesis hemorrágica, pobre cicatrización de lesiones mucosas y cutáneas, tendencia pro-ulcerativa, osteopenia, anormalidades en la dentición y anemia (García-Moran *et al.* 2006).

El Departamento de Agricultura y el Instituto Nacional del Cáncer de los Estados Unidos de Norteamérica, recomienda a los varones ingerir por lo menos 90 mg/día y a las mujeres 75 mg/día de vitamina C procedente de frutas y/o vegetales para reducir el riesgo de cáncer (Grégory *et al.* 2006). En México, Casanueva *et al.* (2005) del Instituto Nacional de Perinatología, recomienda el consumo de 100 mg/día en mujeres embarazadas.

Se ha dado mucha importancia a la vitamina C por su capacidad anti-inflamatoria, anti-cancerígena, anti-oxidante, anti-angiogénica, inmuno-moduladora y anti-viral (gripal). En el metabolismo celular, la vitamina C es cofactor enzimático en al menos 8 reacciones: tres de ellas implicadas en la hidroxilación de la lisina/prolina (durante la formación de colágeno), dos en la biosíntesis de la carnitina (en el transporte de ácidos grasos), dos en las síntesis de hormonas y una en el metabolismo de la tirosina. De todas, la más estudiada es la hidroxilación de la prolina necesaria para la síntesis de colágeno. La vitamina C es esencial para la oxidación de fenilalanina y síntesis de tirosina, la conversión de ácido fólico a ácido tetrahidrofólico (importante en el metabolismo de los aminoácidos), la conversión del triptófano en 5-hidroxitriptófano y producción de serotonina (importante neurotransmisor) y en la formación de norepinefrina a partir de la dopamina. Además, reduce el hierro férrico a ferroso para permitir su absorción intestinal y también está implicada en la transferencia de hierro desde la transferrina plasmática a la ferritina hepática. La alteración de esta función mantiene el hierro en un estado reducido (Fe^{++}) y se manifiesta en una serie de síntomas que van desde la dificultad para la cicatrización y reparación de fracturas, hasta hemorragias en la piel y lesiones en las encías. La vitamina C es soluble en agua y no se almacena por lo que es necesario su consumo constante (Casanueva *et al.* 2005).

Algunas características de la vitamina C favorecen su oxidación irreversible. La sensibilidad a la luz, inestabilidad en pH distinto a 4 y 5, reactividad con metales provocan un estado pro-degradativo de la molécula (Grégory *et al.* 2006). La vitamina C puede reaccionar fácilmente con radicales libres en el interior y exterior de la célula, es capaz de donar un electrón transformándose en una molécula inestable, ascorbil, que puede revertir a ascorbato, el cual puede donar otro electrón y convertirse en DHA (Deshidro-ascorbato) (figura 1), y a su vez puede ser reducido a vitamina C nuevamente.

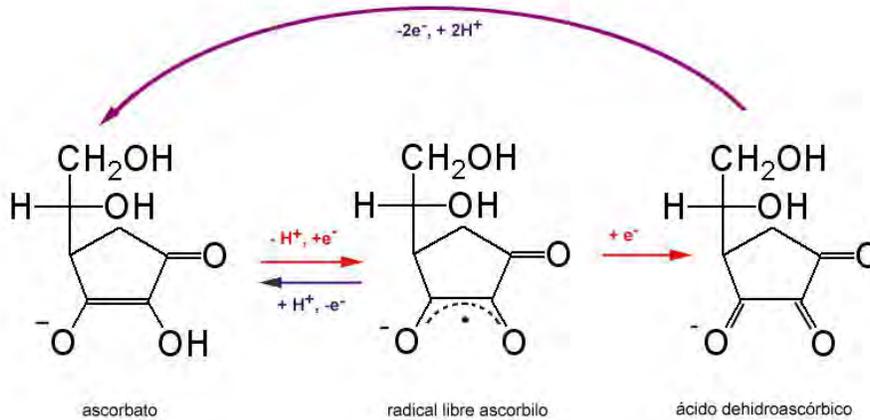


Figura 1: Oxidaciones de la molécula de vitamina C.

[Tomado de: <http://www.iqb.es/nutricion/vitaminac/vitaminac.htm>]

Se ha demostrado que la vitamina C al interactuar con iones de cobre y hierro en el estómago genera radicales hidroxilo, formando una reacción Fenton. Inactiva la catalasa, encargada de la degradación de peróxido de hidrógeno. Además se han descrito efectos citotóxicos y mutagénicos del ascorbato en células aisladas (Zentella y Saldaña, 1995). Se ha descrito un proceso llamado “ascorbilación”, en la cual la vitamina C se une de forma no enzimática a lípidos y proteínas lo que confiere a las proteínas la capacidad de unir cobre (García *et al.* 2006). También se ha sugerido un efecto “filo de navaja, cuello de botella o umbral” el cual a dosis bajas es pro-oxidante y a dosis normales o altas es antioxidante. Las células utilizan las propiedades pro-oxidantes en favor de la generación de radicales libres especializados, que estarían implicados en procesos altamente específicos. También hay que tener en cuenta que la actividad pro-oxidante depende de la presencia colateral de moléculas o átomos que induzcan esta actividad (García *et al.* 2006). Por estas características, se menciona a la vitamina C como el compuesto más paradójico (Zentella y Saldaña, 1995).

Considerando solo las características antioxidantes, se ha propuesto que, mediante la donación de sus electrones, la vitamina C previene que proteínas y otros compuestos celulares se oxiden (Pallauf *et al.*, 2013). Sin embargo, se debe recordar que las ROS se producen constantemente en las células y que es indispensable mantener el equilibrio entre antioxidantes y ROS en el organismo. Ese equilibrio se ve alterado por sustancias genotóxicas que aumentan la concentración de ROS y generan estrés oxidativo propiciando daño celular (Avello y Suwalsky, 2006).

NICOTINA

La nicotina es conocida así por Jean Nicot quien al sembrar tabaco (*Nicotiana tabacum*) y observar sus “numerosas virtudes”, logró introducir el consumo del tabaco en Francia en 1560. Sin embargo, fue hasta 1828 cuando Posser y Reimann aislaron el alcaloide (compuestos orgánicos nitrogenados sintetizados por las plantas que puede causar toxicidad) (Taiz y Zeiger, 2006; De Jaime, 2010). La nicotina se encuentra principalmente en la planta *N. tabacum* y en menores cantidades en tomate, papa, berenjena y pimiento verde. Se calcula que constituye aproximadamente entre 0.6 y el 3% del peso seco del tabaco. Su biosíntesis se lleva a cabo en las raíces y se acumula en las hojas (Hoffmann y Horffmann, 1998). Se encuentra comercialmente en cigarrillos (~1 mg), gomas de mascar, parches transdérmicos, aerosol nasal y tabletas sublinguales (Osorio, 2010). La nicotina es una amina terciaria compuesta por un anillo de piridina y otro de pirrolidina (Osorio, 2010) (Figura 2). Existe en forma de dos isómeros, la L-nicotina y D-nicotina, según la dirección a la que desvían el plano de la luz polarizada, la forma L es la forma activa en la que se encuentra en el tabaco y la de mayor toxicidad (Gause, 1941).

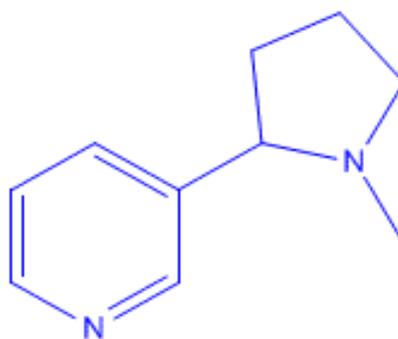


Figura 2: Estructura molecular de la nicotina, 3-(2-(N-metilpirrolidinil)) piridina.
Tomado de: NetQuímicaOrgánica., 2012

La nicotina se absorbe por inhalación (vía pulmonar), a través de la mucosa bucal, plexos sublinguales y por la piel. Comienza su acción al unirse a los receptores colinérgicos-nicotínicos lo que produce excitación neuronal. Al ser absorbida, se une a la superficie de las células que poseen receptores nicotínicos para acetilcolina (nAChRs), induciendo la liberación de numerosos neurotransmisores como adrenalina (epinefrina), noradrenalina (norepinefrina), dopamina, acetilcolina, serotonina, glutamato, β -endorfina, y ácido γ -aminobutírico (GABA). Muchos de estos neurotransmisores actúan como estimulantes mediando algunos efectos psico-conductuales (Osorio, 2010).

Los citocromos (CYP) P450 son los responsables principales de la biosíntesis y metabolismo de compuestos endógenos (xenobiótico). Los CYP450, son una familia de hemoproteínas presentes en numerosas especies, encargadas de acelerar la eliminación de un gran número de fármacos y compuestos tóxicos, pero también son responsables de la activación de toxinas y pre-carcinógenos (Bandrés y Arribas, 2001). En años recientes se ha estudiado la relación entre el CYP2A6 y el metabolismo de la nicotina, encontrando que es responsable, en más de 90%, de la inactivación de la nicotina mediante su oxidación convirtiéndola en cotinina. También se han detectado pequeñas contribuciones del citocromo CYP2B6 en el metabolismo de la nicotina en humanos (Osorio, 2010).

Wright *et al.* (1993) mostraron que la nicotina inhibe la apoptosis inducida por diversos estímulos incluyendo el factor de necrosis tumoral (TNF), la luz UV, fármacos quimioterapéuticos, e ionóforo de calcio. Este fenómeno fue observado en células normales y transformadas derivadas de diferentes tejidos, incluyendo tipos de células tumorales relacionadas con el consumo de tabaco, de manera que si la nicotina actúa como mediador de la inhibición de apoptosis, esto puede contribuir a la patogénesis del cáncer relacionado con el tabaco, no obstante también puede disminuir la eficacia de las terapias contra el cáncer (Wright *et al.* 1993) y al modular dos grandes vías de señalización intracelular (Proteínas cinasas-PKC- y proteínas cinasas activadas por mitógenos-MAP quinasa) se sugiere que la nicotina actúa como promotor de tumores (Heusch y Maneckjee, 1998).

DMSO (DIMETILSULFÓXIDO)

El DMSO [(CH₃)₂SO] (Figura 3), descubierto por Alexander Saytzeff en 1866, es una molécula anfipática muy soluble en medios acuosos y orgánicos, por lo que es un disolvente muy efectivo para compuestos insolubles en agua. Se obtiene como subproducto del procesamiento de la pulpa de madera utilizada en la fabricación de papel. Originalmente era utilizado principalmente en la industria, hasta que en 1963 se descubrieron sus propiedades biológicas (Portales, 1982).

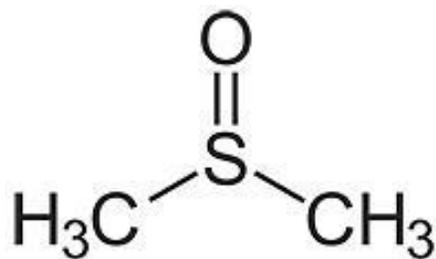


Figura 3: Estructura molecular del Dimetilsulfóxido

Tomado de: <http://www.gesundheitlicheaufklaerung.de/dmsso-ein-verkanntes-wundermittel>

Se considera al DMSO como un agente celular diferenciador, captador de radicales hidroxilo, desacoplador eléctrico intracelular, crioprotector, agente solubilizante utilizado en preparación de muestras para microscopía electrónica, antídoto para la extravasación de agentes anticancerígenos vesicantes y analgésico tópico. Además, se utiliza para el tratamiento de edema cerebral, amiloidosis, cistitis intersticial, y esquizofrenia (Santos *et al.*, 2003). El DMSO es capaz de atravesar la membrana de tejidos animales, se introduce muy rápido a través de la piel y atraviesa las membranas celulares en ratas y cultivos de tejidos humanos, (Colucci *et al.*, 2008). Es usado como disolvente de algunos medicamentos. Moléculas de bajo peso molecular son transportadas a través de la piel con DMSO, mientras que las moléculas de alto peso molecular, como la morfina, disueltas con DMSO logran atravesar hasta un 90% por los tejidos; esta característica fue probada también en vegetales por Leonard en 1967 quién mezcló hierro a concentraciones solubles en DMSO para follaje de naranjos y pomelos con deficiencias en hierro, logrando un reverdecimiento rápido y extensión de la hojas con una mayor concentración de clorofila (Jacob y Herschler, 1986).

El DMSO forma un enlace fuerte con el agua, logrando disminuir su punto de fusión, con lo cual proporciona crioprotección en sistemas biológicos, por lo que se utiliza en la preservación de tejidos, embriones y todo tipo de organismos como insectos (Zhi-Wu y Quinn, 1994).

A pesar de los numerosos beneficios del DMSO, se han descrito diversos efectos secundarios sistémicos como náuseas, vómito, diarrea, hemólisis severa, reacciones anafilácticas manifestadas por erupciones, broncoespasmo, insuficiencia renal, hipertensión diastólica y sistólica, bradicardia, bloqueo cardíaco, y rara vez edema pulmonar y/o paro cardíaco. Además, produce apoptosis, induce diferenciación celular e interrumpe el ciclo celular (Santos *et al.*, 2003).

Para observar el mecanismo de acción de la Vitamina C, Nicotina y DMSO durante el tiempo de vida de un individuo, es indispensable que se realicen estudios *in vivo* con organismos que proporcionen resultados confiables y en el menor tiempo posible, tal como *Drosophila melanogaster*.

MODELO BIOLÓGICO *Drosophila melanogaster*

Drosophila melanogaster, es un organismo modelo que se ha utilizado desde que T. H. Morgan en 1900 introdujo este insecto para las investigaciones en genética (Petitpierre, 1997), debido las siguientes características:

1) El ciclo de vida presenta una serie de eventos sometidos a estricto control de expresión genética. Puede llegar en tan solo 10 días a la etapa de adulto, en condiciones controladas de 25°C y 65% de humedad relativa. Es probable que casi ningún insecto tenga un ciclo de vida de velocidad comparable ya que la mayoría son de ciclos univoltivos o bivoltivos, es decir, tienen una o dos generaciones anuales (Petitpierre, 1997). *D. melanogaster* es un insecto holometábolo porque durante su desarrollo presenta los estadios de huevo, larva, pupa (en donde se lleva a cabo la metamorfosis completa) y finalmente el adulto (Castañeda *et al.*, 2013). El ciclo comienza con la ovoposición, el huevo inicia su desarrollo embrionario temprano (primeras 24 horas de vida), eclosiona la larva que pasa por tres estadios: L1 (larvas de 24 a 47h de edad), L2 (larvas de 48 a 71h) y L3 (larvas de 72 a 96h). A las 96h inicia la transformación de larva L3 a pupa, en este estadio transcurre la metamorfosis (desarrollo tardío) y 5 días más tarde emerge el imago dejando la cutícula endurecida (pupario), terminando su desarrollo endureciendo su exoesqueleto (al inicio de color blanquecino), que al contacto con el aire se tornará en colores sepia. Posteriormente llegará la circulación a las alas (en un inicio enrolladas al dorso) adquiriendo su consistencia rígida (Castañeda *et al.*, 2013) (Figura 4).

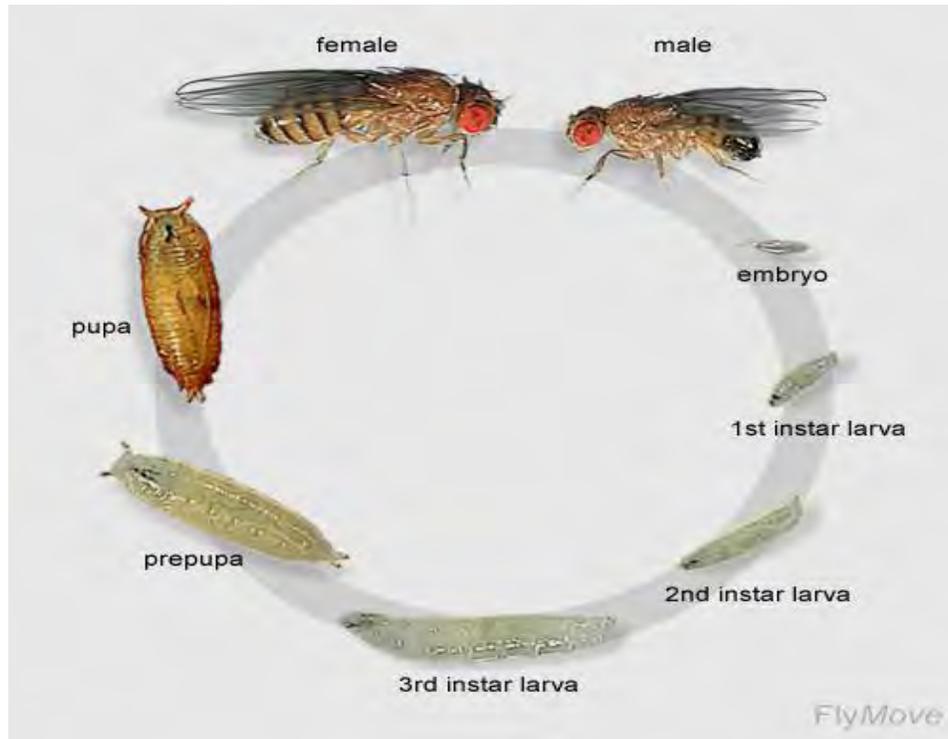


Figura 4: Ciclo de vida de *D. melanogaster*
 Tomado de: <http://flymove.uni-muenster.de/>

D. melanogaster presenta dimorfismo sexual que puede ser observado en microscopio estereoscópico. Las hembras son más grandes y su abdomen termina en forma de corazón. Los machos son más pequeños, su abdomen tiene los últimos 3 segmentos fusionados, mostrándose como una mancha negra en la punta del abdomen (Figura 5) (Castañeda *et al.*, 2013).



Figura 5: Dimorfismo sexual en *D. melanogaster*
 Tomado de: <http://flymove.uni-muenster.de/>

Sin embargo la característica fundamental de los machos son los peines sexuales, un conjunto de 10 a 12 cerdas gruesas en el primer par de patas (tarsos), que sirven para sujetar a la hembra durante la cópula (Figura 6) (Castañeda *et al.*, 2013). Al trascurrir entre 6 y 8h en machos y entre 10 y 12h en hembras, alcanzan la madurez sexual (Castañeda *et al.*, 2013).

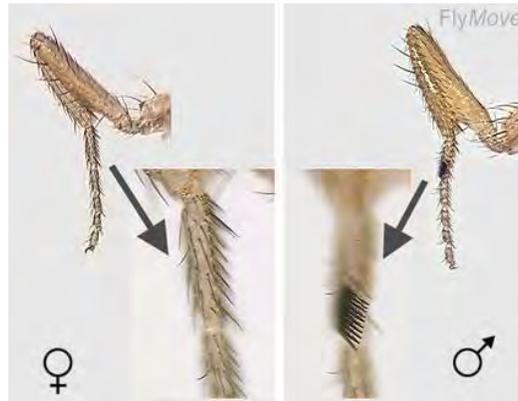


Figura 6: Peines sexuales de *D. melanogaster*
Tomado de: <http://flymove.uni-muenster.de/>

2) Es un organismo de bajo costo de manutención dado que se alimenta de bacterias y levaduras que crecen en los jugos fermentados de frutas en descomposición. Se cultiva en medios instantáneos que consisten en hojuelas con nutrientes balanceados, como el Carolina®; amortiguadores de pH y conservadores, que se hidratan con agua destilada o a la solución problema del tratamiento experimental. Utiliza espacios pequeños como los frascos lecheros mantenidos a incubación de 25°C y 65% de humedad relativa.

3) Produce una gran descendencia. Una hembra es capaz de ovopositar de 600 a 800 huevos en sus 40-60 días de vida.

4) Al tener secuenciado todo el genoma de *D. melanogaster*, se ha podido mostrado una correspondencia entre las proteínas implicadas en la expresión genética y el metabolismo de los seres humanos, sobre todo en el metabolismo xenobiótico. Debido a esto, ha sido utilizado este organismo, como modelo de estudio de enfermedades metabólicas por los investigadores (Adams *et. al*, 2000).

ANTECEDENTES

La vitamina C es un elemento esencial en la dieta de primates, conejillos de indias y murciélagos frugívoros, al no ser sintetizado de manera endógena. Es un buen antioxidante ya que es capaz de donar dos electrones de su doble enlace, por lo cual, se piensa que mediante la donación de sus electrones la vitamina C puede prevenir que proteínas y otros compuestos celulares se oxiden, de tal manera que al aumentar la ingesta de vitamina C, ésta podría retrasar el envejecimiento y promover el aumento de la longevidad (Ames, 1998). Sin embargo se presenta una gran controversia cuando algunos estudios reportan un efecto pro-oxidante de la vitamina C contradiciendo su fama de antioxidante. En las tablas 1-3 se muestran los antecedentes de los distintos efectos de la vitamina C en los modelos de roedores, nematodo y dípteros.

La nicotina, es el componente activo de los cigarrillos y causante de la adicción a los mismos. La L-nicotina es la forma activa que se encuentra en el tabaco y la reportada con la mayor toxicidad (Gause, 1941). En la Tabla 4 se muestran los efectos de la nicotina en *D. melanogaster* y roedores, estos pueden variar dependiendo la línea, el sexo y la especie que se esté trabajando. Sin embargo, vale la pena mencionar que en ambos modelos biológicos las hembras presentan una mayor resistencia a la nicotina y que únicamente las líneas con la mutación relacionada con la enfermedad de Parkinson presentan un incremento de la vida.

El dimetilsulfóxido es una sustancia soluble en medios acuosos y orgánicos por lo que es utilizada como solvente. Muestra efectos beneficios en muestras biológicas como la crioprotección, ya que evita el daño a las células en el momento de la congelación; y en la industria farmacéutica, es mezclado con los medicamentos para obtener el ingreso exitoso de la sustancia activa en el organismo. Sin embargo, presenta efectos secundarios sistémicos como náuseas, vómito, diarrea, hemólisis severa, las reacciones anafilácticas, broncoespasmo, insuficiencia renal, hipertensión diastólica y sistólica, bradicardia, bloqueo cardíaco, etc. Estas contradicciones generan controversia ya que entonces al utilizar el DMSO, podría alterarse el resultado de algún experimento y causar efectos negativos al organismo. En la Tabla 5 se muestra el efecto del DMSO sobre *D. melanogaster* y cultivos de células.

VITAMINA C

TABLA 1. EFECTO DE LA VITAMINA C SOBRE LA LONGEVIDAD DE ROEDORES, NEMÁTODOS Y MOSCAS

Autores (Año)	Modelo biológico	Tratamientos	Resultados
Bezlepkin et al. (1996)	Ratones machos (<i>Mus musculus</i>) C57BL/6J a diferentes edades de inicio de la dieta.	Mezcla de antioxidantes [β -caroteno, α -tocopherol, Selenito de sodio, zinc y ácido ascórbico (50 mg/kg)] en el alimento.	Los ratones de 2 meses aumentaron su esperanza de vida, sin embargo fue mayor que en los de 9 meses. En contraste, cuando se implementó la dieta en las edades de 16 y 23 meses, no hubo diferencias.
Davies et al. (1977)	50 Cobayas (<i>Cavia porcellus</i>) albinos machos (cepa Dunkin-Hartley) de 5 semanas de edad.	25 recibieron suplemento diario de 5mg/Kg de ácido ascórbico y los otros 25 recibieron 1% de ácido ascórbico en agua potable.	No se encontraron diferencias significativas en la forma de administración. Sin embargo, al analizar los resultados se observó que los animales del primer grupo tuvieron una vida 44% mayor que el grupo que recibió 1% de ácido ascórbico en el agua.
Veurink et al. (2003)	Ratones (<i>Mus musculus</i>) deficientes de ApoE	Probaron una dieta alta en grasas en combinación con antioxidantes (acetato de Vitamina E, Ginko biloba, Pycetogenol y Palmitato de ascobilo durante 3 meses.	La longevidad de los ratones aumentó. Concluyen que los antioxidantes hidrosolubles y liposolubles, permiten suministrar una mayor dosis de antioxidantes, sin incurrir en un efecto pro-oxidante. Empero, faltan más estudios para conocer la combinación ideal con la que se obtenga el mejor efecto benéfico.
Bahadorani et al. (2008)	<i>Mosca de la fruta</i> (<i>Drosophila melanogaster</i> , <i>rosy</i> ⁺⁵).	Suplementaron la alimentación con Vitaminas A, E o C .	En condiciones de oxígeno normales, la concentración 20 mM de vitamina C, incrementó la esperanza de vida y mientras que la concentración 100 mM la disminuyó.

Shibamura et al. (2009)	Nematodo <i>Caenorhabditis elegans</i> .	Liposomas con 60, 120 o 240 µg de ácido ascórbico .	Las dosis de ácido ascórbico (60, 120 y 240 µg) tuvieron poco efecto sobre la duración de la vida en el nematodo. No obstante, la concentración 240 µg tuvo influencia mayor en la vida útil del nematodo (efecto dependiente de la dosis).
Massie et al. (1984)	Ratones (<i>Mus musculus</i>) C57BL/6.	Ácido ascórbico 1% y 2% en agua potable.	La esperanza de vida media de los ratones aumentó al suplementar ácido ascórbico (8.6%) sin embargo, la esperanza de vida máxima se mantuvo sin cambios. El 1% de ácido ascórbico no tuvo efecto sobre los niveles de cobre en corazón, hígado, riñones y cerebro, pero una dosis de 2% causó una reducción del 20% en el contenido de cobre cardiaco concluyendo que las dosis altas de ácido ascórbico pueden ejercer efectos tóxicos y reducir la longevidad.

TABLA 2. EFECTO PRO-OXIDANTE DE LA VITAMINA C EN LOS MODELOS BIOLÓGICOS DE RATONES, NEMÁTODOS Y MOSCAS.

Autor (Año)	Modelo biológico	Tratamientos	Resultados
Selman et al. (2006)	Ratones C57BL/6 (<i>Mus musculus</i>)	Administraron ascorbil-2-polifosfato, 180 mg / kg de peso corporal a distintas temperaturas (7± 2°C y 22± 2°C).	Observaron reducción del tiempo de vida (45%) con respecto al control a pesar que la peroxidación lipídica del hígado se redujo significativamente. los organismos con la dieta antioxidante ingirieron más y por tanto consumieron más antioxidantes que afectaron al tiempo de vida de los ratones.
Bakaev y Bakaeva, 2011	Nemátodo (<i>C. elegans</i>) en	Vitamina C (entre 0,0001 y 100 mg/mL) en medio líquido con <i>E.coli</i> .	Las concentraciones 0.001 y 0.1 mg/mL, aplicadas a los 3 días de vida, aumentaron la vida media y máxima del nematodo. Sin embargo, 0.0001 mg/mL o menos y 1 mg/mL o superior no tuvieron efecto significativo en la

	diferentes etapas de desarrollo.	3 a 5 días de vida.)	longevidad. Ninguna de las dosis de ácido ascórbico, aplicadas durante la fase reproductiva de <i>C. elegans</i> (entre 3 y 10 días de vida), tuvieron efecto significativo sobre la esperanza de vida. Después del día 10, el suplemento con Vitamina C acortó la vida media y máxima del nematodo.
Massie et al. (1976)	Mosca de la fruta (<i>Drosophila melanogaster</i>) Línea Oregon R	Experimento 1: Ácido ascórbico (1, 10 y 50mM) cambiando el medio de cultivo cada semana. Experimento 2: Ácido ascórbico (1, 10 y 50mM) y ácido deshidro-ascórbico (1 y 10mM) cambiando el medio de cultivo a diario. Experimento 3: Ácido ascórbico (1, 10 y 50mM) y ácido deshidro-ascórbico (1 y 10mM) , con cambio de medio dos veces al día.	La concentración 1 mM de ácido ascórbico aumentó ligeramente el tiempo de vida de las hembras, sin embargo las concentraciones 10 y 50 mM la disminuyeron 6.9% y 12.8%, respectivamente. Sin embargo, las concentraciones 0.1 y 10 mM, no tuvieron diferencias significativas con respecto al control. La concentración más alta (100 mM) redujo la vida un 5%. Las moscas en los tratamientos con ácido deshidro-ascórbico, mantuvieron sin cambios su tiempo de vida indicando que el ácido ascórbico y no sus productos de oxidación, es responsable de la disminución de la vida. Al cambiar el medio dos veces diarias, la vida útil media en las tres concentraciones de ácido ascórbico disminuyó 8.7 % en comparación con los controles.
Massie et al. (1991)	Mosca de la fruta (<i>Drosophila melanogaster</i>) Línea Oregon R y Sueco C	Ácido ascórbico 1, 10 y 100mM	Registraron el contenido de ácido ascórbico en ambas líneas <i>Drosophila</i> y encontraron una disminución conforme aumenta la edad, más elevada en Sueco C. Al agregar el ácido ascórbico en el alimento encontraron que la concentración 10 mM aumentó ligeramente la esperanza de vida, mientras que 100 mM la disminuye, esto en moscas Oregon R. En la cepa Sueco C

			las concentraciones 1 y 10mM de ácido ascórbico aumentaron ligeramente (2.5 días o 5.5%) la esperanza de vida mientras que, la concentración 100mM no tuvo efecto sobre la longevidad. Sin embargo, al analizar ambos experimentos, concluyen que la dieta de ácido ascórbico tiene poca o ninguna influencia en el tiempo de vida de la mosca.
Sohal et al. (1985).	Mosca (<i>Musca doméstica</i>)	Ascorbato 0.5 y 2%.	La concentración 0.5% de ascorbato no provocó diferencias significativas en la vida útil media de las moscas (18.6 ± 5.4 días frente a 21.6 ± 7.5 días para el grupo de control). La concentración 2% de ascorbato disminuyó significativamente la vida útil media por aproximadamente la mitad (de 9.9 ± 3.8 días). Por otro lado, en cuanto al registro de cambios en antioxidantes endógenos, muestran que el ascorbato 0.5% no cambió la tasa metabólica de las moscas domésticas, mientras que una concentración de 2% de ascorbato fue suficiente para disminuir significativamente su tasa metabólica.

TABLA 3. SIN NINGÚN EFECTO AL USAR VITAMINA C EN ROEDORES Y *C. elegans*

Autor/Año	Modelo	Compuesto	Resultados
Hollozsy (1998)	Ratas (<i>Rattus norvegicus</i>) cepa Long Evans de 3 meses de edad.	Suplementación de antioxidantes: 2.5 g de ácido ascórbico, 2.0 g de α -tocoferol, 0.1 g de β -caroteno y 20 mg de bisulfito sódico de menadiona compleja.	La dieta antioxidante no tuvo efecto sobre la longevidad de ratas sedentarias.

Schulz et al. (2007)	Nemátodos (<i>C. elegans</i>) tipo silvestre 'Bristol N2'.	Vitamina C (5mM) y 2-desoxi-D-glucosa (5mM) y la combinación de ambos en el medio de crecimiento (<i>Escherichia coli</i>).	Encontraron que el tratamiento con vitamina C y la combinación con 2-desoxi-D-glucosa, no muestran efectos significativos sobre la longevidad. El tratamiento con solo 2-desoxi-D-glucosa mostró un incremento de la longevidad.
Tappel et al. (1973)	Ratones (<i>Mus musculus</i>) CD-1 machos.	Combinación de antioxidantes: Ácido ascórbico, α -tocoferol, hidroxitolueno butilado, Metionina, Selenito de Sodio.	La dieta se suplementó a partir de los 9 meses de edad hasta 1.9 años (edad que representa la vejez en ratones). Los resultados mostraron que en ningún caso la dieta tuvo un efecto significativo sobre la esperanza de vida de los ratones.

NICOTINA

TABLA 4: EFECTO DE LA NICOTINA EN *D. melanogaster* Y ROEDORES.

Autor y (año)	Modelo biológico	Tratamientos	Resultados
Chambers et al. (2013)	Moscas de la fruta (<i>D. melanogaster</i>). Mutantes <i>park</i> ²⁵ y moscas control ^{w¹¹¹⁸} (cepa de donde fue generada <i>park</i> ²⁵)	Nicotina 0, 9 y 12µg/mL (0.08mM)	Las mutantes <i>park</i> ²⁵ tuvieron un incremento (5 días o 15%) de la vida media con 9µg/mL de nicotina, respecto a las no sometidas a nicotina (26/31 días). La concentración 12µg/mL no tuvo efecto sobre la vida media. Las moscas control sometidas a la misma concentración (9µg/mL), disminuyeron la vida media a 55 días (55/64 días) y a 12µg/mL disminuyó hasta 50 días (50/64 días). Concluyen que los beneficios de la nicotina están restringidos a las moscas con la mutación <i>park</i> ²⁵ .

Deudne et al. (2012)	<i>Machos de D. melanogaster</i> (20 moscas/vial. 10 repeticiones por tratamiento)	Nicotina 8.9 μ L (0.5 nM) y testigos, con cambio de alimento cada siete días. Trascurridos los primeros 7 días, a los individuos tratados con nicotina y a los controles se les provocaron la enfermedad de Parkinson con 30 y 40 mM de Rotetone.	La nicotina ofrece neuroprotección en el tratamiento con 40 mM de rotetone y 0.5 nM de nicotina comparado con el control en el que las moscas murieron 18% más rápido. Esto muestra que los machos de <i>Drosophila</i> silvestre son sensibles a la nicotina, y el único beneficio es cuando adquieren la enfermedad de Parkinson.
Trinh et al. (2010)	<i>D. melanogaster park^{Z472/Z472y}</i> silvestres (WT)	Extracto de nicotina (0.3 \pm 0.26 μ g/mL) se utilizaron grupos de moscas (10 o 20 individuos) con la misma edad. El alimento se cambió cada 2 días.	El tiempo de vida de <i>D. melanogaster</i> con la mutación <i>park</i> aumentó 37.5%, comparadas con las control (40/55 días), mientras que las de tipo silvestre no experimentaron ningún efecto.
Erat et al. (2007)	Ratas (<i>Rattus norvegicus</i>) (Sprague–Dawley)	Nicotina 0.5 mg/kg (0.0513mM)	La nicotina disminuyó la actividad de la glutatión reductasa en hígado, corazón, pulmones, estómago, riñón y testículos. Aunque incrementó la actividad de la glutatión reductasa en cerebro (~11.8%) y no tuvo efecto en músculo. Concluyen que el consumo de nicotina disminuye la defensa antioxidante del organismo.
Hatchell y Collins. (1980)	Ratones (<i>Mus musculus</i>) cepas: C57, DBA y C3H (hembras y machos)	0.1 mg de nicotina inyectada en sólo una ocasión. 180 ratones de edades entre 57 \pm 3 días. Se les inyectó la nicotina y se cuantificó a los 2.5, 5, 10, 20 y 40 min.	Las hembras metabolizaron con mayor rapidez la nicotina en las cepas C57 y C3H, mientras que a cepa DBA no mostró diferencias. Los machos de esta cepa, presentaron mayor concentración de nicotina en el cerebro a los 10 y 20 min, de la misma manera que los de la cepa C3H a los 20 min. La actividad motora se vio afectada en ambos sexos desde los 2.5 min después de la

			inyección. Los machos de todas las cepas presentaron menor actividad motora en comparación con las hembras.
Rosecrans (1972)	Ratas (<i>Rattus norvegicus</i>) machos y hembras	(CD)	Nicotina 400 µg/kg, ratas de ambos sexos fueron inyectadas con nicotina y sacrificadas 5, 10, 15, 30, 60 y 90 min después. El segundo grupo de ratas recibieron 4 dosis diarias de nicotina y después de 24 horas se les dio otra dosis para ser sacrificadas a los 15 o 30 min después
Collinset al. (1988)	Ratas (<i>Rattus norvegicus</i>) línea Sprague-Dawley hembras		Tratamientos crónicos con nicotina 1.6 mg/kg
Caldorone et al. (2008)	Ratas (<i>Rattus norvegicus</i>) machos y hembras (C57BL/6J)		Nicotina 50, 100 y 200 µg/mL administrada en el agua potable
			Aumentó el número de uniones al receptor en más regiones del cerebro, relacionándose con el desarrollo de tolerancia. La disminución de la sensibilidad se incrementó con el transcurso de los días. Mostrando un menor efectos en la actividad locomotora y temperatura corporal.
			Los machos presentaron activación de la locomoción con la concentración 100 µg/ml, mostrando que son más sensibles a las propiedades estimulantes de la nicotina crónica, sin embargo se encontró que la nicotina es ansiogénica en hembras y sin efecto en machos.

DIMETILSULFÓXIDO (DMSO)

TABLA 5: EFECTO DEL DIMETILSULFÓXIDO EN *D. melanogaster* Y CULTIVOS CELULARES

Autor (año)	Modelo biológico	Tratamientos	Resultados
Nazir et al. (2003)	<i>Drosophila melanogaster</i> (hsp70-lacZ)	DMSO (0.0, 0.1, 0.3, 0.5, 1.0, 2.0, y 3.0%).	A partir de la concentración 0.5% provoca citotoxicidad y deterioro del desarrollo y desempeño reproductivo de las moscas, en cambio la concentración de 0.3% no presentó efectos adversos por lo que concluyen que es ésta la concentración más viable para utilizarse sin riesgo de toxicidad en <i>D. melanogaster</i> .
Massie et al. (1985)	<i>Drosophila melanogaster</i>	DMSO 0.5%.	La concentración 0,5% (0,060M) de DMSO causó reducción del 33.3% en el período de vida completo (larva y adulto) en comparación con reducción de 11.8% cuando se alimenta solamente durante la edad adulta. A dosis bajas (menores del 0.5%) el dimetilsulfóxido resultó ser no tóxico.
Hebling et al. (2015).	Células odontoblasto MDPC-23	de DMSO (0.05, 0.1, 0.3, 0.5 y 1.0 mM) en el cultivo celular por 24 hrs.	Ninguna de las concentraciones afectó el número, adhesión o muerte celular, sin embargo se encontró disminución significativa en la producción total de proteínas en las concentraciones 0.5 y 1.0 mM.
Simsek et al. (2012).	Cultivo celular 4T1 y 4THMpc derivado de una línea celular de cáncer de mama en ratón	Los cultivos celulares fueron mantenidos en 1.4 µM de DMSO durante 24 hrs.	El DMSO resultó más citotóxico que la talidomina (utilizada de referencia), en ambas líneas celulares. También induce la actividad de la caspasa-3 involucrada en apoptosis.
Vázquez-Gómez et al. (2010).	<i>D. melanogaster</i> Oregon-flare y multiple wing hair.	5.5 µL de DMSO mezclado con Tw80-EtOH.	Redujo los niveles de mRNA en los genes Cyp6g1 y Cyp6g2, es decir, modula la actividad enzimática Inhibiendo la transcripción. Se concluye que se debe considerar el efecto negativo del DMSO al trabajar con elementos biológicos.

**Dueñas-
García et al.
(2012).**

*Bioensayo SMART
en alas de D.
melanogaster*
cruzas estándar y
de bioactivación
elevada.

5.5 µL de DMSO
mezclado con Tw80-
EtOH (DTE).

La mezcla DTE provoca disminución en la frecuencia espontánea de clones mutantes en la prueba SMART, concluyen que quizá la capacidad del DMSO de ser buscador de radicales hidroxilo, contribuya a este resultado “positivo” sin embargo, dejan abierta la posibilidad de que lejos de ser un efecto protector pueda ser reflejo de un efecto citotóxico o de apoptosis

JUSTIFICACIÓN

La vitamina C, es considerada un excelente antioxidante, he incluso se ha pensado que el consumo constante podría prevenir el envejecimiento, ya que dona dos de sus electrones para evitar que otras moléculas se oxiden, y así mantiene el buen funcionamiento celular en todo el organismo. Por otro lado, en ocasiones presenta un efecto pro-oxidante, ya que puede interactuar con iones de cobre y fierro formando radicales hidroxilo, además puede desactivar algunas enzimas como la catalasa, responsable de la conversión de peróxido de hidrógeno a agua. Por lo tanto, la vitamina C provoca controversia entre muchos autores.

Así como existen productos con fama de antioxidantes, hay otros que a pesar de numerosos estudios que indican los riesgos de su consumo, siguen siendo comercializados. Hay diferentes vías de admisión que permiten la introducción de la nicotina al organismo, entre ellas fumar cigarrillos es la forma más prevalente de adicción y al alcance de la población. La nicotina resulta problemática dado que se relaciona con problemas a la salud como cáncer (en pulmones, labio o lengua y garganta), enfermedades del corazón y vasos sanguíneos, insomnio, bronquitis, enfisemas, degeneración de la retina e incluso problemas en el embarazo.

Los estudios con modelos biológicos, en los que se realizan las pruebas de ciertos productos, utilizan solventes para asegurar el paso de la sustancia en cuestión a través del organismo. El dimetilsulfóxido, por su característica anfipática, puede disolver medios acuosos u orgánicos, por lo que es un solvente muy utilizado. Sin embargo, existen evidencias que muestran sus numerosos efectos secundarios, como náuseas, vómito, diarrea, bloqueo cardiaco e incluso interrumpe el ciclo celular.

Ya que no existe gran evidencia científica sobre el efecto en la esperanza de vida al consumir y/o utilizar la vitamina c, nicotina y DMSO, resulta necesario realizar estudios *in vivo*, con la finalidad de determinar su efecto en la longevidad.

OBJETIVOS

GENERAL

- Evaluar el efecto de la vitamina C, la nicotina y el DMSO en la longevidad de *Drosophila melanogaster* Canton S⁺.

PARTICULARES

- Comprobar el efecto de vitamina C (0.2, 2.0 y 20 mM), nicotina (0.08 y 0.62 mM) y DMSO (0.15, 0.3 y 0.6% v/v) sobre la longevidad de *D. melanogaster*.
- Determinar si existen diferencias en la longevidad entre machos y hembras de *D. melanogaster* expuestas a nicotina, vitamina C y/o DMSO.

HIPÓTESIS

De acuerdo con los antecedentes se esperaría:

- Que la vitamina C alargue la vida de *Drosophila melanogaster*, es decir que promueva la longevidad.
- Que la nicotina, en ambas concentraciones, acorte la esperanza de vida de *D. melanogaster*.
- Que el DMSO a la concentración de 0.6 % acorte la vida, pero a las concentraciones 0.3 y 0.15 % no presente efecto sobre la longevidad de *D. melanogaster*.

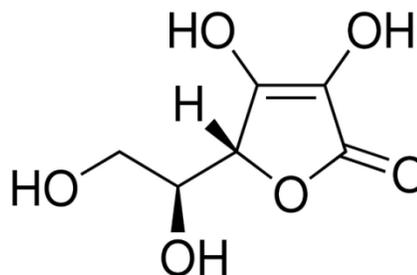
MATERIALES

QUÍMICOS

Agentes químicos utilizados en este estudio

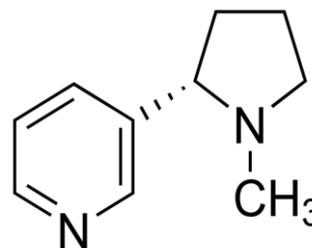
Vitamina C

Grado reactivo, cristalina
Sinónimo: L-Ácido -Threoascorbico,
factor de antiescorbútica, Vitamina C
Fórmula molecular: $C_6H_8O_6$
(SIGMA-ALDRICH)
CAS: 50-81-7



Nicotina

$\geq 99\%$ (GC), líquido
Sinónimo: (-) - 1-metil-2- (3-piridil) pirrolidina,
(S) -3- (1- metil- 2- pirrolidinil) piridina
Fórmula molecular: $C_{10}H_{14}N_2$

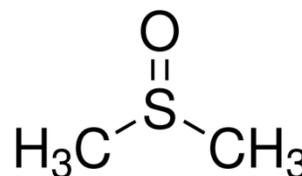


(SIGMA-ALDRICH)
CAS: 54-11-5

Dimetilsulfóxido

Reactivo ACS, $\geq 99.9\%$
Sinónimos: DMSO, Sulfóxido de dimetilo

Fórmula molecular: C_2H_6OS



(SIGMA-ALDRICH)

CAS 67-68-5

Otros:

- Solución conservadora: 5mL de tegosept al 12% (OH) y 5mL de ácido propiónico aforados a 1 litro de agua (Dueñas *et al.*, 2001).
- Hojuelas de papa deshidratada marca Maggi®

- Levadura fresca marca La Florida®
- Medio de cultivo instantáneo (DIM): *Drosophila Instant Medium* (Carolina Biological Supply Co. Burlington N.C. USA).

BIOLÓGICOS

- **Línea de *D. melanogaster*:** Canton S⁺ donada originalmente por la Dra. Norma Velázquez Ulloa de Lewis and Clark Collegeen Portland, Oregon, USA. Propagada y mantenida en el Laboratorio de Genética Toxicológica de la FES-Iztacala, UNAM.

MÉTODOS

PROPAGACIÓN Y COLECTA DE HUEVOS

La línea silvestre Canton S⁺ de *D. melanogaster* se propagó durante aproximadamente 1 mes en medio de 5 g de hojuelas de papa marca Maggi® y 20 mL de solución conservadora (ácido propiónico y Tegosept) (Dueñas *et al.*, 2001); en frascos de 250 mL con tapones de hule espuma.

Se realizó la colecta de huevos durante 22 h (Linford *et al.*, 2013), en condiciones de obscuridad a 25°C y 60-80% de humedad relativa. La colecta se realizó en frascos de 250 mL con levadura de cerveza fresca, marca La Florida®, activada con azúcar y agua. Después de tres días se recuperaron las larvas de tercer estadio (72 ± 11 h) lavándolas con agua corriente a temperatura ambiente con un colador de malla fina. Se depositaron las larvas en frascos con medio fresco de hojuelas de papa marca Maggi® y se incubaron de nuevo a 25°C.

SINCRONIZACIÓN DE EDADES

El ciclo de vida de *D. melanogaster* es de 10 días, bajo condiciones de laboratorio (25°C y 60-80% de HR), y el tiempo de incubación de 22h, se eliminaron los imagos que emergieron en el noveno día y solo se utilizaron los individuos emergidos el décimo día. De esta manera se aseguró que todos los individuos experimentales tuvieran la misma edad. Se permitió que éstos alcanzaran la madurez sexual y por lo tanto su reproducción durante 2 días.

EXPERIMENTACIÓN

Se separaron las moscas por sexo con ayuda de un microscopio estereoscópico. Se colocaron 10 individuos de cada género en tubos de plástico, en un extremo del tubo se colocó una tapa con 0.25 g de medio de cultivo Carolina® hidratado con 0.5 mL del tratamiento.

Los tratamientos fueron: Agua miliQ como testigo solvente, DMSO (0.15, 0.3 y 0.6%) como testigo de acortamiento de vida; Nicotina (0.08 y 0.62mM) y vitamina C (0.2, 2.0 y 20 mM) como testigo de alargamiento de la esperanza de vida.

Se realizaron cuatro experimentos independientes con ocho réplicas por sexo.

REGISTRO DE DATOS

Cada 3er día se cambió el medio hidratado con el tratamiento correspondiente y cada semana se reemplazaron los tubos (para evitar contaminación o que las moscas tratadas se mezclaran con su descendencia), además de contabilizar el número de moscas vivas por cada unidad experimental en el momento del cambio de alimento (Linford *et al*, 2013).

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Con los datos se realizaron gráficas de dispersión.

- Se compararon las pendientes entre ambos sexos para cada tratamiento y por cada sexo con los diferentes tratamientos.
- Se realizó la comparación entre pendientes con la prueba de t para pendientes (paquete minitab17).
- Se obtuvo la comparación de pendientes de cada tratamiento con el testigo (agua).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el presente trabajo se evaluó el efecto de la vitamina C, la nicotina y el DMSO en la longevidad de *D. melanogaster*, mediante la técnica modificada de Linford *et al.* (2013). Después de realizar el análisis estadístico, se encontraron los siguientes resultados (Figuras 8-13 y Tablas 6 – 10).

VITAMINA C

La concentración 20 mM de vitamina C acortó el tiempo de vida de *D. melanogaster*. Al tercer día de experimentación, todas las moscas habían perecido, por lo que se decidió disminuir la concentración en un orden de magnitud, es decir, se utilizó vitamina C 2 mM. Ahora el deceso del 100% de las moscas se presentó al 6to día del experimento (Figuras 8 y 9). En consecuencia, se probó una concentración 10 veces menor que la anterior, vitamina C 0.2 mM. Esta concentración nuevamente acortó del tiempo de vida de la mosca (Figura 10 y 11).

La comparación de resultados entre 20 mM de vitamina C y el control (Agua miliQ) muestra un acorte del 92.3% en moscas de ambos sexos, a 2 mM el acorte fue de 84.6% (en ambos sexos) y a la concentración 0.2 mM disminuyó el tiempo de vida un 42.85% en machos y 36.3% en hembras, sin diferencias significativas entre sexos (Tabla 8).

El análisis de comparación de pendientes entre las diferentes concentraciones de vitamina C empleadas (0.2, 2.0 y 20 mM) no mostró diferencias significativas en machos (Tabla 6a), no obstante en hembras existen diferencias entre la concentración 0.2 mM con 2.0 y 20.0mM (Tabla 6b).

COMPARACIÓN DEL PROMEDIO DE VIDA DE *DROSOPHILA MELANOGASTER* SOMETIDA A LAS DIFERENTES CONCENTRACIONES DE VITAMINA C EMPLEADAS EN AMBOS SEXOS.

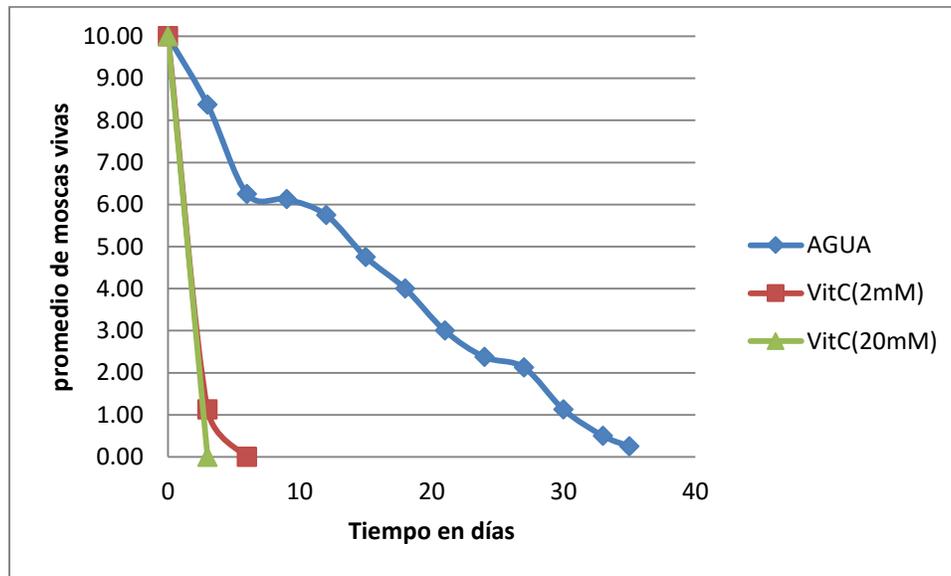


FIGURA 8: Comparación del tiempo de vida bajo los tratamientos de vitamina C (2.0 y 20 mM) y el testigo Agua miliQ en **machos**. Se observa que ambas concentraciones acortaron el tiempo de vida de *D. melanogaster* con respecto al control (agua).

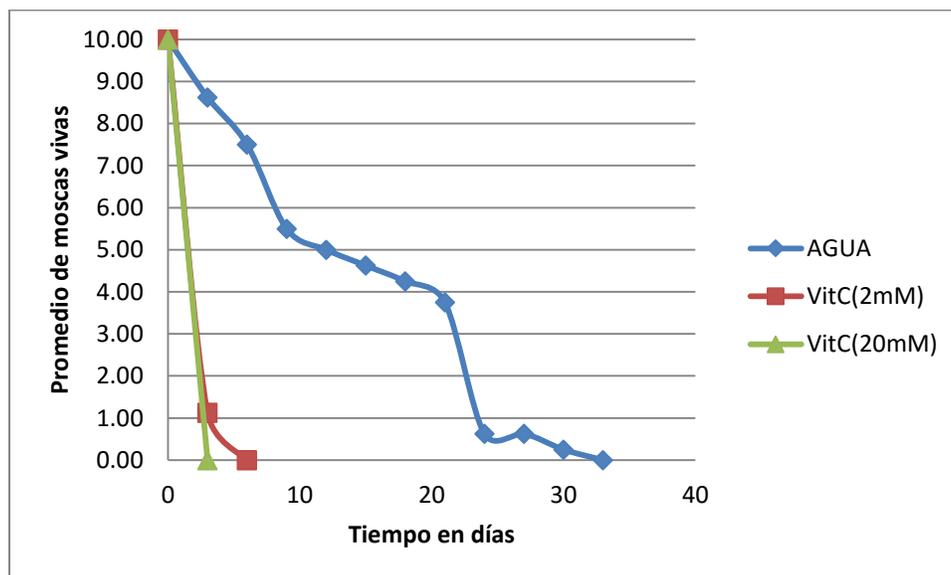


FIGURA 9: Comparación del tiempo de vida de las moscas bajo los tratamientos de vitamina C (2.0 y 20 mM) contra el testigo Agua miliQ en **hembras**. Se observa que ambas concentraciones acortaron el tiempo de vida de *D. melanogaster* con respecto al control (agua miliQ).

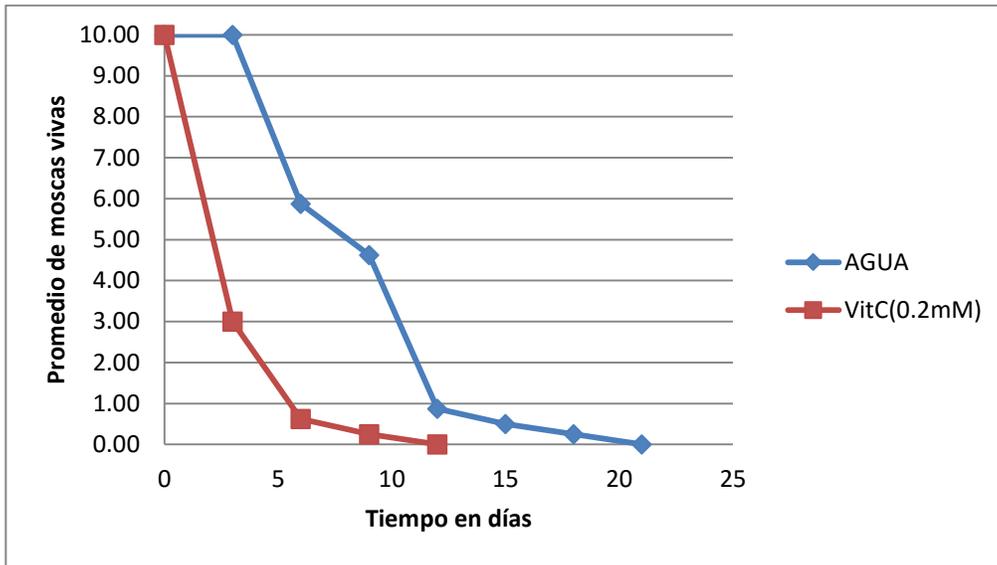


FIGURA 10: Comparación del tiempo de vida bajo el tratamientos de vitamina C 0.2 mM y el testigo Agua miliQ en **machos**. Se observa que acorta el tiempo de vida de *D. melanogaster* con respecto al control (agua).

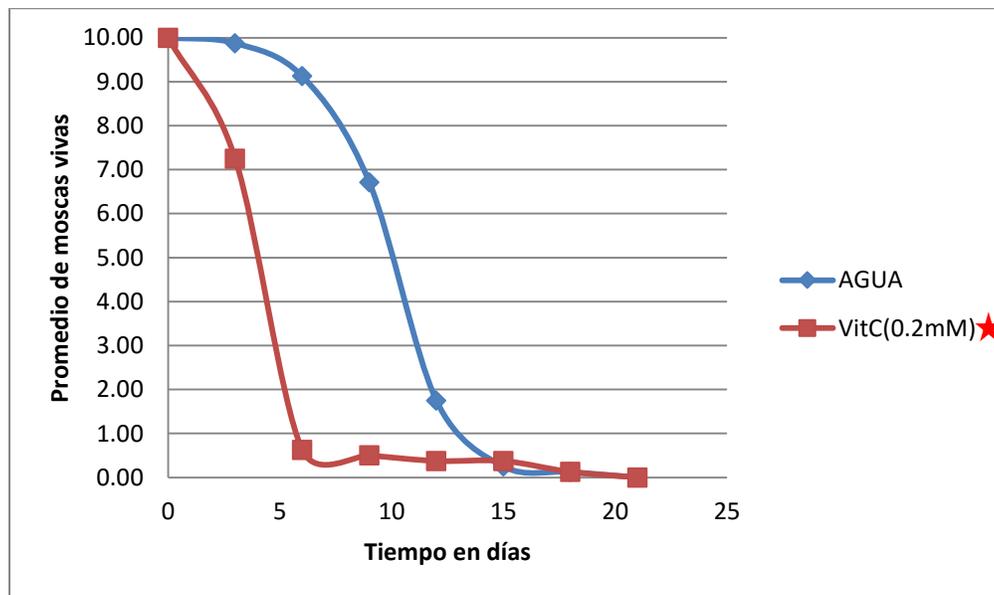


FIGURA 11: Comparación del tiempo de vida de las moscas bajo el tratamientos de vitamina C 0.2 mM contra el testigo Agua miliQ en **hembras**. Se observa que se acorta el tiempo de vida de *D. melanogaster* con respecto al control (agua). Donde (★) indica que existen diferencias significativas entre la concentración 0.2 mM con el resto de las concentraciones de vitC.

TABLA 6: ANÁLISIS DE COMPARACIÓN ENTRE PENDIENTES DE LAS MOSCAS EXPUESTAS A LAS DIFERENTES CONCENTRACIONES DE VITAMINA C EN MACHOS Y HEMBRAS (PAQUETE MINITAB17).

a) Vitamina C en machos.

Tratamientos	Pendientes	Valor de T	Valor de P
VitC 20mM vs VitC 2mM	-1.67 vs -1.67	0	1.0
VitC 20mM vs VitC 0.2mM	-1.67 vs -0.76	-1.48	0.1894
VitC 2mM vs VitC 0.2mM	-1.67 vs -0.76	1.78	0.1253

Ninguna de las concentraciones mostro diferencias en el tiempo de vida de los organismos, observándose el valor de $P > \alpha \rightarrow 0.05$, en todas las concentraciones.

b) Vitamina C en hembras

Tratamientos	Pendientes	Valor de T	Valor de P
VitC 20mM vs VitC 2mM	-1.67 vs -1.67	0	1.0
VitC 20mM vs VitC 0.2mM	-1.67 vs -0.43	-2.82	0.0225*
VitC 2mM vs VitC 0.2mM	-1.67 vs -0.43	-2.82	0.0225*

Las concentraciones de 20 mM vs 0.2 mM y 2 mM vs 0.2 mM, mostraron diferencias significativas* en el tiempo de vida de los organismos, en donde el valor de $P \leq \alpha \rightarrow 0.05$.

TABLA 8: ANÁLISIS DE COMPARACIÓN DE PENDIENTES ENTRE MACHOS Y HEMBRAS DE CADA TRATAMIENTO DE VITAMINA C UTILIZADO (PAQUETE MINITAB17).

Tratamiento	Machos	Hembras	t	P
VIT C 0.2mM	-0.7583	-0.4257	1.66	0.0739

El análisis comparativo entre sexos no arrojó diferencias significativas en el tiempo de vida de los organismos, observándose una $P > \alpha \rightarrow 0.05$. *Nota: No se obtuvieron suficientes datos de los tratamientos vitC 2.0 y 20 mM para realizar el análisis estadístico en ambos sexos.

Estos resultados muestran que, en general, todas las concentraciones de vitamina C acortaron el tiempo de vida de *D. melanogaster*, en ambos sexos con respecto al testigo. La reducción drástica de la sobrevivencia en todas las concentraciones de vitamina C pone en duda la hipótesis relacionadas con el incremento en la longevidad (Sadowska, 2014) al menos en *D. melanogaster*. Estos resultados contrastan con los datos de Bahadorani *et al.* (2008), en donde observaron que al utilizar *D. melanogaster* (*rosy*⁺⁵) expuesta a la concentración 20 mM aumentaba su esperanza de vida 13%, no obstante, la concentración 100 mM la acortaba 41%. Es probable que estos resultados se asocien con la cepa utilizada, debido a que las mutantes *rosy*⁺⁵ poseen un tercer cromosoma isogénico (Reaume *et al.*

1991) que podría brindarle protección extra frente al efecto pro-oxidante de la vitamina C ya que genes como *mus308* (implicado en las vías de tolerancia al daño) y *mus304* (implicado en la respuesta al daño celular), por mencionar algunos, están presente en el cromosoma 3 (López, 2003). Por otro lado, Massie *et al.* (1976), encontraron resultados parecidos a los del presente trabajo. Utilizando la cepa Oregon R, la concentración de 1mM de vitamina C aumentó ligeramente el tiempo de vida de las hembras, sin embargo, las concentraciones 10 y 50 mM disminuyeron la esperanza de vida en un 6.9% en hembras y 12.8% en machos, permitiendo observar que a concentraciones mayores a 1 mM de vitC, se reduce la esperanza de vida de los organismos.

Tomando en cuenta que el cambio de alimento, en este estudio, fue cada tercer día, queda en duda si la acumulación de los productos de oxidación de la vitamina C podrían ser los responsables de la disminución observada en el tiempo de vida de *D. melanogaster*. Massie *et al.* (1976), realizaron otro experimento en el que cambiaban los medios diariamente. La vida media de las moscas fue ahora similar a los controles (agua) en las concentraciones de 0.1 y 10 mM de vitamina C. Sin embargo, la concentración 100 mM causó una reducción del tiempo de vida (5%). Un tercer experimento realizado por Massie *et al.* 1976, en el cual, se mantuvo a las moscas en los medios suplementados con el producto de oxidación de la vitamina C (ácido deshidro-ascórbico; 1 y 10 mM); mostró que la vida media permaneció sin cambios, lo que indica que la reducción de la esperanza de vida es un resultado directo de la vitamina C y no de sus productos de oxidación. Por último, probaron cambiar el alimento 2 veces al día. Sin embargo, la modificación no provocó efecto benéfico significativo en la vida media ya que ese parámetro disminuyó en las tres concentraciones de vitamina C hasta en 8.7% (Massie *et al.* 1976). En conjunto, con los resultados de nuestro estudio, donde se cambiaba el medio cada tercer día, se fortalece la conclusión que la vitamina C acorta el tiempo de vida de la mosca, además que, no participa la periodicidad en el cambio de alimento ni los productos de oxidación.

Shibamura *et al.* (2009), utilizando al nematodo *C. elegans*, mostraron que el ácido ascórbico administrado mediante liposomas aumentó significativamente la vida media y máxima de éste; también compararon los resultados con otro experimento en el cual se agregó el ácido ascórbico a los medios de cultivo, en la misma dosis, sin efecto benéfico en el tiempo de vida. Sin embargo, Schulz *et al.* (2007), suministraron al nematodo *C. elegans*, 5 mM de vitamina C y la combinación de 2-desoxi-D-glucosa con vitamina C, determinando que en ambos tratamientos hubo efecto nulo en el tiempo de vida.

Por otro lado, Selman *et al.* (2006) mostraron que al suplementar vitamina C a ratones de campo, disminuyó su tiempo de vida, aun cuando los niveles de peroxidación lipídica disminuyeron. El resultado lo atribuyeron a una mayor ingestión de alimento que estaba enriquecido con antioxidantes, es decir, que la hiperfagia permitió un mayor ingreso de vitamina C al organismo y por lo tanto afectó su metabolismo, pero ayudó a contrarrestar la peroxidación lipídica. No se puede descartar la posibilidad que el efecto nulo en los estudios utilizando *C. elegans* (Schulz *et al.* (2007) sean el resultado de una inadecuada dosificación a estos animales. No obstante, Holloszy (1998) suplementó una mezcla antioxidante incluido el ácido ascórbico, a ratas (*Rattus norvegicus*), y no presentaron cambio significativo en el tiempo de vida.

Es ahora necesario revisar si la vía de administración (el alimento hidratado con la vitamina C), influyó en el comportamiento pro-oxidante de la vitamina C. Estudios con roedores muestran dos vías de administración, en el agua de bebida o en la comida. Davies *et al.*, (1977), trabajaron con cobayas, probaron ambas vías de administración del ácido ascórbico: presentando el compuesto en la comida, observaron que vivían más en comparación con las que adquirirían el ácido ascórbico en el agua. No obstante, el suplemento de vitamina C (5 mg/kg) no mostró resultados significativos en la extensión de la vida. Aunque no utilizaron un control para comparar, al analizar las muertes de los seis primeros animales tratados con vitamina C, tenía un tiempo de vida más largo (44%) de los animales que recibieron el 1% de ácido ascórbico en el agua potable (Pallauf *et al.* 2013).

De acuerdo con Sandowska, 2014, los antioxidantes administrados en los medios de cultivo pueden no ser incorporados al organismo modelo y por tanto es difícil estimar la cantidad ingerida sobre todo cuando las altas dosis del antioxidante pueden conducir al rechazo de alimentación y por tanto producir hambre (Sandowska, 2014). En humanos, los beneficios de la vitamina C en la dieta, al parecer están más relacionados con la prevención de la enfermedad del escorbuto. Por otro lado, aunque se suplementaran grandes cantidades de vitamina C, los niveles de plasma sanguíneo no se elevaría por encima de un cierto nivel, provandose en voluntarios sanos. Esto llevó a la hipótesis de que la vitamina C no tiene ningún valor adicional si se consume en altas dosis, sin embargo, se promueve el aumento en la cantidad recomendada diaria hasta 200 mg / día (Levine *et al.* 1996).

Como ya se mencionó, primates, murciélagos frugívoros y conejillos de Indias (cobayas) carecen de la enzima L-Gulono-1-Lactona-oxidasa (GULO), la cual se encarga de sintetizar el 2-Ceto-1-gulolactona, que es el precursor inmediato del ácido ascórbico. Por lo que,

Pallauf *et. al.*, 2013 menciona que los modelos biológicos con deficiencia de esta enzima pueden parecerse más a los humanos que aquellos organismos que producen el ácido ascórbico endógeno. Aunque las enzimas que contribuyen a la síntesis de ácido ascórbico en *D. melanogaster* no han sido caracterizadas en detalle, se ha encontrado que las moscas contienen vitamina C sin que se consuma a través de su dieta (Massie *et al.*, 1991). Por lo tanto, se puede considerar el modelo biológico de *D. melanogaster* como útil para estudios en donde se utilizan elevadas concentraciones de vitamina C (Pallauf *et. al.*, 2013),

Debido a la controversia que ha causado el estudio de la vitamina C, se ha sugerido que podría tener un efecto “filo de navaja, cuello de botella o umbral”, debido a que en bajas dosis tiene un efecto pro-oxidante mientras que en dosis altas es antioxidante (García *et.al*, 2006). Los resultados obtenidos en este estudio, muestran que si bien todas las concentraciones empleadas disminuyeron el tiempo de vida de *D. melanogaster*, la concentración con mayor efecto reductor de la vida es la concentración 20 mM, y el menor efecto coincide con la de menor concentración empleada (0.2 mM), con lo que se descarta un efecto filo de navaja y más de concentración dependiente. Tomando en cuenta que la actividad pro-oxidante depende de la presencia de moléculas o átomos que la induzcan, por ejemplo metales de transición (García, y otros, 2006), puede llevar a pensar que el medio de cultivo al que se hidrató con el tratamiento contuvo estas moléculas, sin embargo el medio de cultivo Carolina®, no contiene metales de transición, por lo que esta idea podría descartarse. No obstante, sería interesante conocer la interacción endógena de la vitamina C a nivel genético, ya que las interacciones de la misma, en el interior de la célula, son las que dan como resultado el efecto antioxidante o pro-oxidante de la vitamina C.

Por otro lado, Massie y colaboradores (1991) probaron los cambios del ácido ascórbico con la edad en *Drosophila melanogaster*; proponen que la presencia de cobre (mayores cantidades en insectos que en mamíferos), promueve la inestabilidad de este reactivo durante el envejecimiento debido a que el cobre acelera la auto-oxidación del ácido ascórbico debido quizá a que el cobre cataliza esta auto-oxidación.

NICOTINA

La nicotina 0.08 mM redujo el tiempo de vida de machos en 61.54%, (Figura 10). En contraste en hembras, esta concentración extendió el tiempo de vida un 6% (Figura 11).

Del mismo modo, la concentración 0.62 mM de nicotina (CL_{50} de *D. melanogaster* Cantón S⁺) (Dra. Velázquez-Ulloa, com. per.), redujo la vida del 46.1% en machos y 27.2% en hembras.

La comparación entre los tratamientos con nicotina y agua, muestra diferencias significativas en los experimentos con machos. Mientras que en hembras únicamente la concentración 0.62 mM arrojó diferencias significativas, incluso, las moscas suplementadas 0.08 mM vivieron un poco más que las control (Agua miliQ) aunque las diferencias no son significativas (Tabla 9). Al contrastar los resultados con ambas concentraciones de nicotina, se determinaron diferencias significativas en ambos sexos, observando una relación dosis respuesta (Tabla 10).

La concentración 0.62 mM de nicotina no presenta diferencias al contrastar el efecto en machos y hembras. Sin embargo, la concentración 0.08 mM de nicotina, presenta diferencias entre sexos, mostrando a las hembras más resistentes al tratamiento (Cuadro 11).

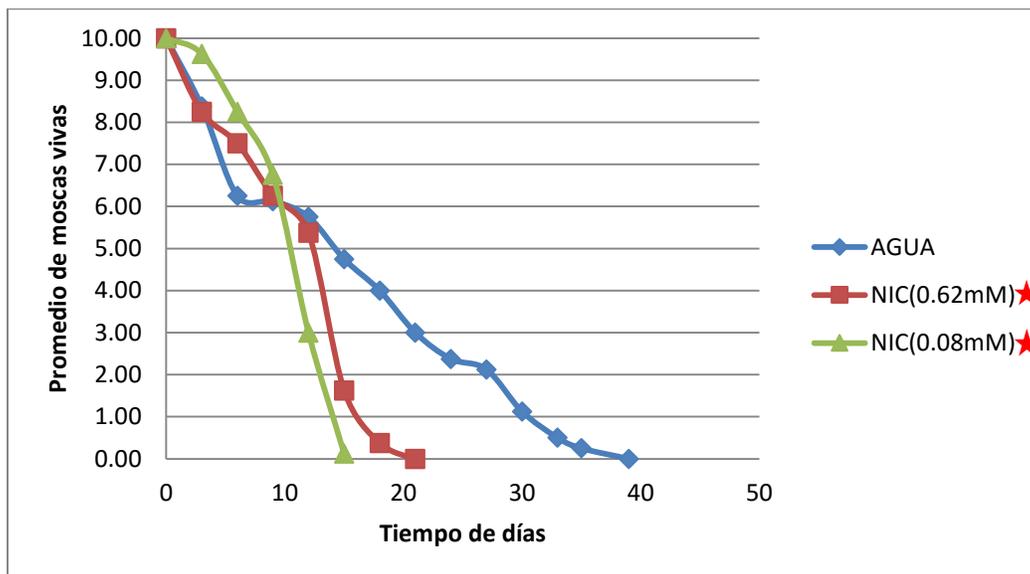


FIGURA 10: Comparación de la nicotina (0.08 y 0.62 mM) contra el testigo Agua miliQ en machos. Se observa que ambas concentraciones acortaron el tiempo de vida de *D. melanogaster*, sin embargo tuvo un mayor acorte la concentración 0.08 mM. Donde (★) indica que existen diferencias significativas del tratamiento testigo y las concentraciones de nicotina.

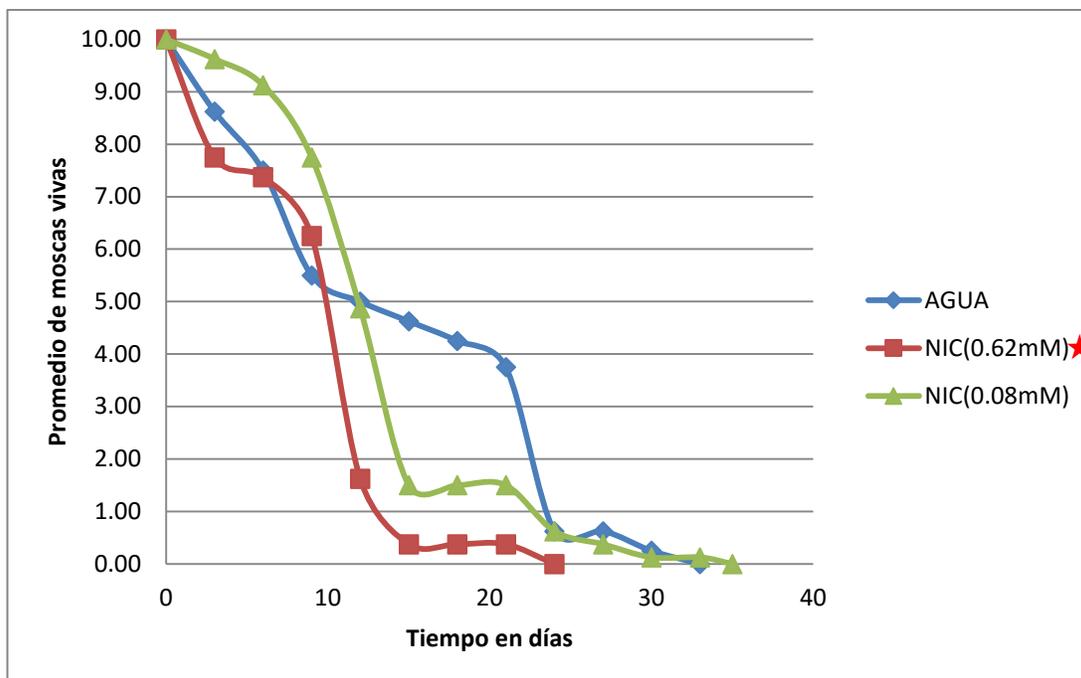


FIGURA 11: Comparación del tiempo de vida bajo el tratamiento de nicotina (0.08 y 0.62mM) contra el testigo (Agua miliQ) en **hembras**. Se observa que la concentración 0.62 mM acortó el tiempo de vida de *D. melanogaster*. La concentración 0.08 mM logró aumentar la vida ligeramente (6%), sin embargo no se encuentran diferencias estadísticas. Donde (★) indica diferencias significativas en el tratamiento testigo y las concentraciones de nicotina.

TABLA 9: ANÁLISIS DE COMPARACIÓN ENTRE LOS TRATAMIENTOS NICOTINA VS. AGUA

Tratamientos comparados	Pendientes machos	Machos	Pendientes hembras	Hembras
Agua vs NIC 0.8 mM**	-0.67	T=-4.24, P=0.0027	-0.32	T=-0.25, P=0.4036
Agua vs NIC 0.62 mM	-0.51	T=-6.27, P=0.0004	-0.45	T=-2.33, P=0.0263

**Se utilizaron menos datos para el análisis.

La comparación entre los tratamientos de nicotina con el testigo (AguamiliQ) mostró diferencias significativas en machos, donde la $P \leq \alpha \rightarrow 0.05$. Sin embargo en hembras solo la concentración 0.62 mM mostró diferencias significativas con respecto al testigo., donde $P \leq \alpha \rightarrow 0.05$.

TABLA 10: ANÁLISIS DE COMPARACIÓN ENTRE LAS CONCENTRACIONES DE NICOTINA PARA CADA SEXO USANDO LA PRUEBA ESTADÍSTICA DE T PARA PENDIENTES (PAQUETE MINITAB17)

a) Nicotina en machos

Tratamientos	Pendientes	Valor de T	Valor de P
Nic 0.08 mM vs Nic 0.62 mM	-0.67 vs -0.51	-2.29	0.0409*

La comparación entre las concentraciones de nicotina empleada presentó diferencias significativas* entre si, donde $P \leq \alpha \rightarrow 0.05$.

b) Nicotina en hembras

Tratamientos	Pendientes	Valor de T	Valor de P
Nic 0.08 mM vs Nic 0.62 mM	-0.33 vs -0.45	2.4	0.0262*

La comparación entre las concentraciones de nicotina empleada presentó diferencias significativas* entre si, donde $P \leq \alpha \rightarrow 0.05$.

TABLA 11: ANÁLISIS DE COMPARACIÓN DE PENDIENTES ENTRE MACHOS Y HEMBRAS DE CADA TRATAMIENTO DE NICOTINA UTILIZADO (PAQUETE MINITAB17)

Tratamiento	Machos	Hembras	t	P
NIC 0.62 mM	-0.5074	-0.4486	-1.16	0.1420
NIC 0.08 mM	-0.6738	-0.3236	5.01	0.0012

La comparación entre machos y hembras con respecto a las concentraciones de nicotina empleada mostró diferencias significativas en la concentración 0.8 mM, donde $P \leq \alpha \rightarrow 0.05$.

Tal como se esperaba la nicotina acortó el tiempo de vida en las moscas, principalmente en machos, (aunque en hembras la concentración 0.08 mM no tuvo ese efecto). Estos resultados coinciden con los reportados por Chambers *et al.* (2013), quienes probaron nicotina 0.08 mM en *D. melanogaster* (W^{1118}), y encontraron disminución del tiempo de vida del 21.8% comparado con el control. Crowley-Weber *et al.* (2003) encontraron que la nicotina activa el factor de transcripción NF-kb, que participa en la respuesta inmune, apoptosis, y que es activado por algún tipo de estrés; se demostró que las especies reactivas de oxígeno (ROS) se incrementan desde concentraciones bajas de nicotina (8µM). De acuerdo con Rodríguez y Céspedes (1999) las (ROS) ocasionan daño a la célula,

que correlaciona con aceleración del envejecimiento, aunque no está esclarecido su participación. Lo que sí está comprobado es que estos daños ocasionan un mal funcionamiento de la célula, llevando a la muerte celular (Rodríguez y Céspedes, 1999).

Por otro lado, Shaw *et al.* (2000), en un estudio epidemiológico, reportaron que el consumo de un cigarrillo disminuye 11 minutos la esperanza de vida en los varones. Por tanto se podría suponer que los organismos que consumen nicotina, disminuirían su tiempo de vida. Los resultados de este estudio, donde la concentración 0.62 mM de nicotina disminuyó el tiempo de vida de *D. melanogaster* 46.1% en machos (Figura 10) y 27.2% en hembras (Figura 11) apoyarían esa suposición. Es importante hacer notar que en el tratamiento con 0.08 mM de nicotina ocurre algo controversial: la disminución en machos fue mayor que con 0.62 mM, es decir, una menor concentración de nicotina decrece aún más el tiempo de vida de las moscas macho (61.54%). Deudne *et al.* (2012), utilizaron 8.9 μ L (0.5 nM) de nicotina en moscas macho (silvestre), mostrando un acortamiento de la vida 18% más elevado que a las moscas inducidas con Parkinson. Sin embargo, Trinh *et al.* (2010) usando la concentración 0.3 ± 0.26 μ g/mL de nicotina libre del tabaco, no obtuvieron ningún efecto en el tiempo de vida de las moscas control (silvestre).

En hembras el efecto es distinto, es decir, la concentración 0.08mM no acortó el tiempo de vida de *D. melanogaster*. No existen estudios publicados con nicotina y *Drosophila* que apoyen las diferencias entre los sexos reportados en este trabajo. Hatchell y Collins (1980), inyectaron nicotina a ratones macho y hembra de tres cepas, obtuvieron una marcada diferencia; las hembras, presentaron una mayor rapidez metabólica (mayor resistencia), mientras que los machos exhibieron una mayor cantidad de nicotina en cerebro así como menor capacidad motora. Es decir, estos datos sugieren que la cepa y el sexo tienen importancia primaria en la sensibilidad de los organismos a la nicotina. Las ratas hembras aumentan el número de uniones a receptor en tratamientos crónicos de nicotina, relacionándose con el desarrollo de tolerancia y una menor sensibilidad a nicotina según lo reportado por Collins, Romm y Wehner (1988). Las ratas hembras muestran mayor acumulación de nicotina en el cerebro que los machos, diferencia que disminuye con el tiempo después de una sola infusión y después de la administración repetida de la nicotina (Rosencrans, 1972). En el estudio de Caldorone, King y Picciotto (2008) se probó que la nicotina activa la locomoción a menor concentración en ratas machos (C57BL/6J), mostrando que las hebras presentan una mayor resistencia a la nicotina. Expresan que es posible que las diferencias sexuales de las ratas sean debido a los estrógenos. Benowitz *et al.*, en el 2006 estudiaron las diferencias sexuales entre seres humanos y encontraron que

las mujeres metabolizan más rápidamente la nicotina debido, quizá, a las hormonas sexuales ya que contrastaron a mujeres que usaban anticonceptivos contra las que no los usaban, exhibiendo un incremento mayor en el metabolismo en las mujeres que usaban anticonceptivos, por lo que proponen que los estrógenos juegan un papel fundamental en el metabolismo de la nicotina. Sin embargo, en el modelo biológico empleado en este estudio, *D.melanogaster*, no puede comprobarse esta teoría debido a la ausencia de estrógeno en este organismo.

Otro factor a destacar es el genético, ya que, así como en mamíferos, la determinación del sexo en las moscas se da por cromosomas sexuales XY. En las moscas el cromosoma 1 (que es el X) es el que presenta la mayor cantidad de genes relacionados con la reparación de daños (*locus mus*) (FlyBase), a diferencia de los mamíferos, en las hembras de *D. melanogaster* ambos cromosomas "X" son activos. Existe por consiguiente mayor expresión de los genes ubicados en dicho cromosoma en hembras que en los machos que presentan un solo cromosoma 1 (por ser "XY"). Algunos de los genes de reparación del DNA ubicados en el cromosoma X han sido estudiados por mutantes como *mus* (**mutagen-sensitive loci**) mutantes sensibles a mutágenos, presentando el *mus101*, *mus102*, *mus105*, *mus106*, *mus108*, *mus111*; también *mei9* (**meiotic loci**), mutantes deficientes en el proceso de mitosis, destacando el *mei9* y *mei41*; (López, 2003; FlyBase). El CYP18a1 de *D. melanogaster* es miembro del clan de la familia CPY2 de mamíferos, del cual se desprende el CYP2B6 responsable del metabolismo de la nicotina, es decir, es probable que la nicotina sea metabolizada por este citocromo que en particular se encuentra en el cromosoma X de *D. melanogaster*, contribuyendo entonces a incrementar la protección de las moscas hembras a este compuesto (Plant, 2003).

Tomando en cuenta lo anterior, y considerando que las moscas también presentan un tipo de hormonas sexuales similares a los estrógenos, podría ser en que las hembras metabolicen más rápido la nicotina debido a la presencia de estas hormonas sexuales (De Loof, y Huybrechts, 1998), y como tal adquieran una mayor resistencia a la misma. Existen genes de reparación asociados al cromosoma X, y ya que en hembras presentan una cantidad mayor de genes de reparación por tener dos cromosomas X, les brinda mayor protección. Por lo tanto se justificaría que las hembras no disminuyeron su esperanza de vida. Aun no se puede afirmar con total seguridad lo anterior debido a las diferencias en el modelo biológico usado (*Drosophila melanogaster* Vs. roedores Vs. humanos) y por lo tanto sería imperativo realizar más estudios en *D. melanogaster* evaluando simultáneamente la

actividad de los receptores nicotínicos, la vía de administración de la nicotina, el tiempo de vida y la línea utilizada para dilucidar estas cuestiones.

Es de anotar, que en el tratamiento de nicotina, se observa un efecto de hormesis, el cual corresponde a un efecto beneficioso a dosis bajas, pero que se comporta como tóxico a dosis más altas (Días de Santos, 1997), al menos en hembras se mostró evidente este efecto, sin embargo, en machos la concentración más baja (0.08 mM), afectó más el tiempo de vida.

DIMETILSULFÓXIDO (DMSO)

Como se esperaba, la concentración 0.6% de DMSO, disminuyó el tiempo de vida de *D. melanogaster* en 76.9% en ambos sexos. La concentración 0.3% propuesta Nazir *et al.* (2003), disminuyó 30.7% en machos y 18.1% en hembras. La concentración 0.15% de DMSO determinando que disminuye el tiempo de vida de los machos un 69.24% (Figura 12) no afecta a las hembras (Figura 13).

En el análisis de pendientes, la comparación entre los tratamientos de DMSO (0.15, 0.3 y 0.6 %) arrojó diferencias significativas entre las concentraciones 0.6 vs. 0.15% y 0.6 vs. 0.3% en machos Cuadro 13a). No obstante, puede apreciarse que las moscas sometidas a la concentración 0.3%, vivieron más tiempo que las sometidas a 0.15%. En hembras, todos los tratamientos presentaron diferencias significativas entre ellos (Tabla 13b).

No obstante, la prueba de comparación de pendientes entre machos y hembras, no reveló diferencias significativas entre sexos (Cuadro 14), aunque al observar las gráficas, se puede apreciar que en la concentración 0.15% de DMSO, los machos vivieron hasta el día 9 y en hembras hasta el día 33 de la experimentación.

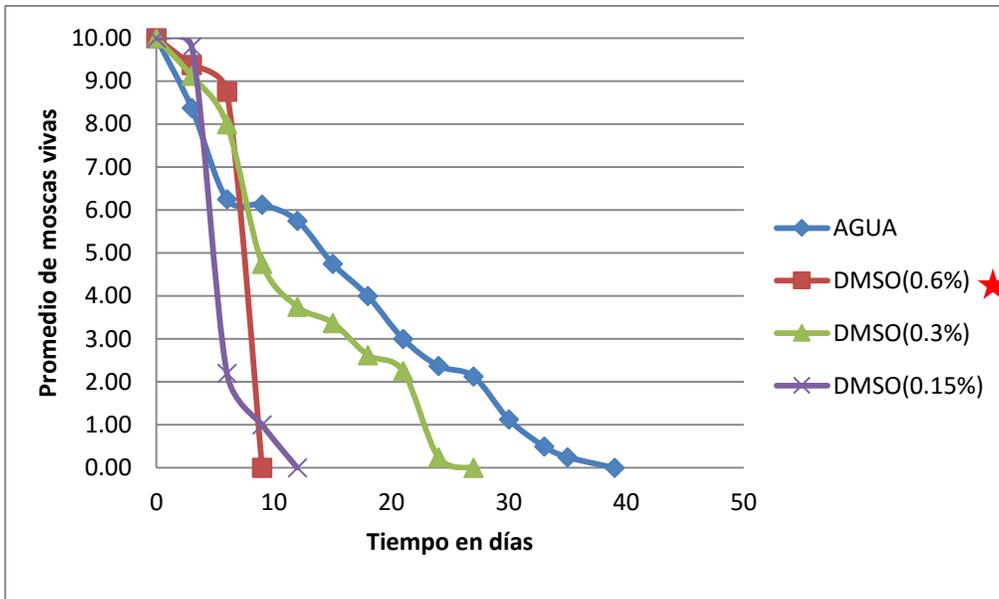


FIGURA 12: Comparación del tiempo de vida bajo la concentración de DMSO (0.6, 0.3 y 0.15%) contra el testigo Agua mliQ en machos. Se observa que las tres concentraciones acortaron la vida de *D. melanogaster* obteniendo un mayor acortamiento a 0.6% y el menor a 0.3% en machos. Donde (★) indica que existen diferencias significativas entre tratamientos.*

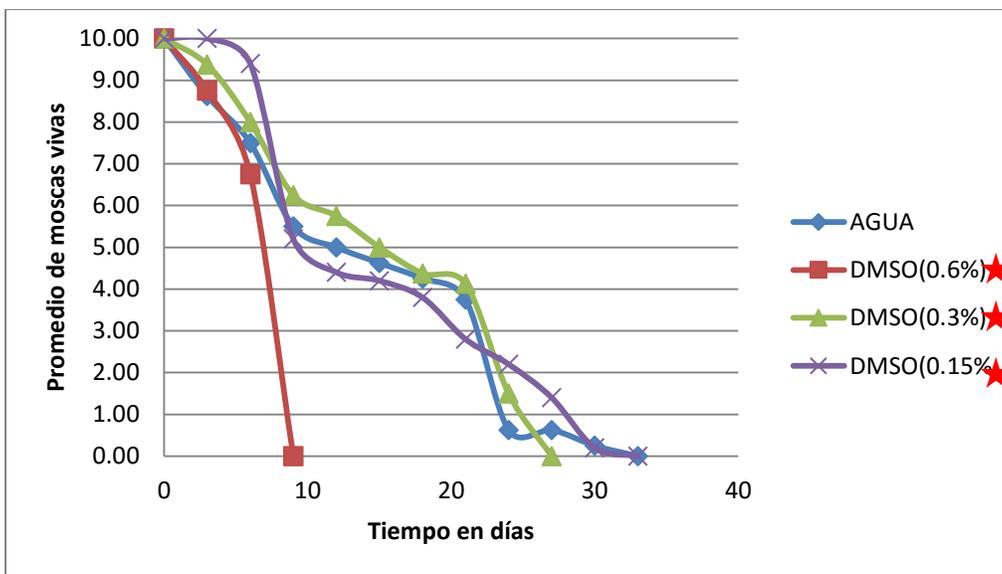


FIGURA 13: Comparación del tiempo de vida bajo la concentración del DMSO (0.6, 0.3 y 0.15%) contra el testigo Agua miliQ en hembras. Se observa que las concentraciones 0.6 y 0.3% acortaron el tiempo de vida de *D. melanogaster*, y la concentración 0.15% tuvo el mismo tiempo de vida que le control. Donde (★) indica que existen diferencias significativas entre tratamientos.*

*Sin diferencias significativas entre machos y hembras.

TABLA 12: ANÁLISIS DE COMPARACIÓN ENTRE LOS TRATAMIENTOS DE DMSO VS. AGUA

Tratamientos comparados	Pendientes machos	Machos	Pendientes hembras	Hembras
Agua vs DMSO 0.3%	-0.27	T=-0.95, P=0.1979	-0.32	T=-0.33, P=0.3755
Agua vs DMSO 0.15%	-0.22	T=0.60, P=0.2798	-0.24	T=-1.73, P=0.0547

La comparación del testigo contra las concentraciones de DMSO empleadas no mostró diferencias significativa, donde $P > \alpha \rightarrow 0.05$. No se muestra la comparación con la concentración 0.6% por la insuficiencia de datos para el análisis estadístico debido a la mortalidad que se presentó desde los primeros tiempos.

TABLA 13: ANÁLISIS DE COMPARACIÓN ENTRE LAS CONCENTRACIONES DE DMSO PARA CADA SEXO USANDO LA PRUEBA ESTADÍSTICA DE T PARA PENDIENTES (PAQUETE MINITAB17)

a) DMSO en machos

Tratamientos	Pendientes	Valor de T	Valor de P
DMSO 0.15% vs DMSO 0.3%	-0.22 vs -0.27	1.43	0.1646
DMSO 0.15% vs DMSO 0.6%	-0.22 vs -1.02	3.08	0.0071*
DMSO 0.3% vs DMSO 0.6%	-0.27 vs -1.02	3.13	0.0065*

La comparación entre las concentraciones de DMSO empleadas mostró diferencias significativas* entre la concentración 0.6% con las otras concentraciones. Donde $P \leq \alpha \rightarrow 0.05$.

b) DMSO en hembras

Tratamientos	Pendientes	Valor de T	Valor de P
DMSO 0.15% vs DMSO 0.3%	-0.24 vs -0.32	2.29	0.0307*
DMSO 0.15% vs DMSO 0.6%	-0.24 vs -1.07	2.44	0.0267*
DMSO 0.3% vs DMSO 0.6%	-0.32 vs -1.07	2.27	0.0383*

La comparación entre las concentraciones de DMSO empleadas mostró diferencias significativas* entre todas las concentraciones. Donde $P \leq \alpha \rightarrow 0.05$.

TABLA 14: ANÁLISIS DE COMPARACIÓN DE PENDIENTES ENTRE MACHOS Y HEMBRAS DE CADA CONCENTRACIÓN DE DMSO USANDA (PAQUETE MINITAB17)

Tratamiento	Machos	Hembras	t	P
DMSO 0.3%	-0.2745	-0.3170	1.66	0.0864
DMSO 0.15%	-0.2233	-0.2405	0.3796	0.3554

La comparación entre machos y hembras sometidos a las distintas concentraciones de DMSO no muestran diferencias significativas. Donde $P > \alpha \rightarrow 0.05$. No se muestra la comparación con la concentración 0.6% por la insuficiencia de datos para el análisis estadístico debido a la mortalidad que se presentó desde los primeros tiempos.

Los resultados con 0.6% de DMSO concuerdan con los reportados por Nazir *et al.* (2003), quienes demostraron que las concentraciones de 0.5% y superiores, provocan citotoxicidad en larvas y moscas de *D. melanogaster*; al igual que los resultados mostrados por Massie *et al.* (1985) quienes, utilizando 0.5% de DMSO, encontraron reducción de la vida de la mosca del 33.3% cuando se expusieron desde larvas y del 11.8% en las alimentadas desde adultas. En contraste, la concentración 0.3% considerada como por Nazir *et al.* (2003), como la óptima para utilizarse en estudios sobre larvas y moscas de *D. melanogaster*, en el presente estudio, acortó el tiempo de vida 30.7% en machos 18.1% en hembras (sin diferencias estadísticamente significativas). La concentración 0.15% genera resultados distintos en ambos sexos. En machos disminuyó la vida 69.24%, más que la concentración 0.3%, presentando el fenómeno de hormesis, mientras que en hembras no se presentó este fenómeno (0.15%).

Hebling *et al.* (2015) mostraron que el DMSO afecta la integridad en células del odontoblasto, aunque no llega provoca la muerte celular, disminuye significativamente la producción total de proteínas; Simsek *et al.* (2012, utilizaron el cultivo celular 4T1 y 4THMpc de ratón derivado de una línea celular de cáncer de mama, y encontraron que el DMSO es más citotóxico que la Talidomina, el cual es un potente agente teratogénico que provoca inhibición del crecimiento de los miembros (dismelia) en el ser humano y que produce acciones antiangiogénicas (Campbell-Walsh, 2008); además, induce la actividad de la caspasa-3 involucrada en apoptosis. Lo anterior, sugiere una participación perjudicial de este compuesto en estudios *in vitro*, en los cuales se usa como solvente (Simsek *et al.* 2012). Estudios *in vivo* con *Drosophila melanogaster* muestran que la combinación de solventes (DMSO/Tw80/EtOH), conducen a la inhibición de la transcripción de los genes Cyp6g1 y Cyp6g2, relacionados con la resistencia al DDT (Flybase), modula la actividad enzimática y disminuye la frecuencia de machas en la prueba SMART. Sin embargo la prueba SMART, no descarta que este resultado se deba a la promoción de apoptosis, lo que le convertiría en un solvente aún más dañino (Vázquez-Gómez *et al.*, 2010 y Dueñas-García *et al.*, 2012). Lo que se puede deducir con lo anterior, es que el uso de DMSO como solvente para estudios en sistemas biológicos resulta dañino para los organismos utilizados,

mostrando efectos indeseados para los fines de los proyecto, al igual que en los estudios clínicos (Santos *et. al.* 2003). .

CONCLUSIONES

Por lo tanto, para este modelo biológico y bajo estas condiciones experimentales se puede concluir que:

- La nicotina disminuyó el tiempo de vida de las moscas macho en ambas concentraciones con mayor efecto en la concentración más baja y con efecto diferencial entre los sexos.
- Contrario a lo esperado, las diferentes concentraciones de vitamina C acortaron la vida de *D. melanogaster* Canton S⁺ con un efecto concentración-respuesta. Esto posiblemente debido a un efecto pro-oxidante.
- El DMSO, en todas las concentraciones usadas, afectó la longevidad de *D. melanogaster* ya que acortó el tiempo de vida.
- Las hembras de *D. melanogaster* mostraron mayor resistencia a los tratamientos con nicotina y DMSO (0.15%) que los machos.

BIBLIOGRAFÍA

- Adams, M., Celniker, S., Holt, R., Evans, C., Gocayne, J., Amanatides, P., & Scherer, S. (2000). The Genome Sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science. The Drosophila Genome*, 287.
- Ames, B. (1998). Micronutrients prevent cancer and delay aging. *Elsevier* , 5-18.
- Arango, G. (2008). *Alcaloides y Compuestos Nitrogenados*. Medellín : Universidad Antioquia .
- Bahadorani, S., Bahadorani, P., & Phillips, J. y. (2008). The Effects of Vitamin Supplementation on *Drosophila* Life Span Normoxia and Under Oxidative Stress. *Journal of gerontology: Biological Sciences*, 63A(1), 35-42.
- Bakaev, V. y. (2011). *Effect of Ascorbic Acid on Longevity In the Nematoda Caenorhabditis elegans*. Retrieved from <http://www.quantum.plus.com/lr/lr88.htm>
- Bandrés, F y Arribas, E. (2001). Aspectos fundamentales del Citocromo P450. Fundación Tejerina.
- Benowitz, N., Lessov-Schlaggar, C., & Swan, G. y. (2006). El sexo femenino y el uso de anticonceptivos orales aceleran el metabolismo de la nicotina. *Clin. Pharmacol*, 480-8.

- Besabe, T. (2000). Funciones de la Vitamina C en el metabolismo del colágeno. *Rev Cubana Alimentación Nutrición*, 14(1), 46-54.
- Bezlepkin, G., & Sirota, N. y. (1996). The prolongation of survival in mice by dietary antioxidants depends on their age by the start of feeding this diet. *Elsevier*, 227-234.
- Campbell-Wallsh. (2008). Urología . Madrid: Panamericana.
- Camps, D. (2010). *Bioquímica del estrés oxidativo* (1 ed.). Laie.
- Cano, A., & Arnao, M. B. (2004). Actividad antioxidante hidrofílica y lipofílica y contenido en Vitamina C de zumos de naranja comerciales: relación con sus características organolépticas. *Ciencia Tecnología Alimentación*, 4(3), 185-189pp.
- Casanueva, E; Angulo, M; Goidberg. S; Pfeffer, F; Maza-Camacho, C; Vellido-Ortega, F y Rothernberg, S. (2005). Bases para estimar las necesidades de vitamina C en la gestación. *Scielo*, 273-277.
- Castañeda-Partida, L., Heres-Pulido, M., & Dueñas-García, I. (2013). *Drosophila melanogaster*. Edo. México. México: UNAM.
- Chambers, R; Call, G; Meyer, D; Smith, J; Techau, J; Pearman, K; Buhlman, J. (2013). Nicotine increases lifespan and rescues olfactory and motor deficits in a Drosophila model of Parkinson's disease. *Elsevier. Behavioural Brain Research*, 253., 95– 102.
- Collins, A; Romm, E y Wehner, J. (1988). Nicotine tolerance: an analysis of the time course of its development and loss in the rat. *Psychopharmacology*, 7-14.
- Colucci, M., Maione, F., Bonito, M., Piscopo, A., Di Giannuario, A., & Pieretti, S. (2008). New insights of dimethyl sulphoxide effects (DMSO) on experimental in vivo. *Elsevier*, 57, 419–425.
- Crowley-Weber, C; Dvorakova, K; Crowley, C; Bernstein, H; Bernstein, C; Garewal, H y Payne, C. (2002). Nicotine increases oxidative stress, activates NF-kB and GRP78, induces apoptosis and sensitizes cells to genotoxic/xenobiotic stresses by a multiple stress inducer, deoxycholate:relevance to colon carcinogenesis. *Elsevier*, 53-66.
- Dabrowska, C., Moya M. (2009). *Vitaminas y antioxidantes*. Madrid. España: Grupo Saned.
- Davies, J; Ellery, P y Hughes, R. (1977). Dietary ascorbic acid and life span of guinea-pigs. *Elsevier*, 215–216.
- De Jaime Loren, J y De Jaime Ruiz, P. (2010). Ácido Nicotínico, Ácido Oxinicotínico, Nicotenía, Nicotelina, Nicotiana, Nicotianina, Nicotina, Nicotinamina, Nicotinell, Nicotenismo. Moncada, Valencia : Universidad CEU Cardenal Herrera .
- De Loof, A y Huybrechts, R. (1998). "Insects Do Not Have Sex Hormones": A Myth? *Elsevier*, 245-260.
- Deudne, L. (2012). Nicotine-induced neuroprotection in Drosophila models of parkinson's diseases. Licenciado en ciencias. *Coastal Caroline University*.

- Dueñas, I.E., Heres, M.E., Castañeda, P.L., Graf U. (2001). Easy rising of *Drosophila melanogaster* consisting of mashed potato flakes and a preservative solution. Technique note. *Drosoph.Inf.Serv.*, 84, 166.
- Dueñas-García, I; Santos-Cruz, L; Castañeda-Partida, L; Castañeda-Sortibrán, A; Ordaz-Tellez, M; Sánchez-Santos, A; Durán-Díaz, A; Rodríguez-Arnaiz, R y Heres-Pulido, M. (2012). Interactions of sulforaphane and dimethyl sulfoxide with methyl methanesulfonate, urethane, 4-nitroquinoline-1-oxide and hydrogen peroxide in the *Drosophila melanogaster* wing spot test. *Elsevier* , 4479–4486.
- Erat, M; Ciftci, M; Gumustekin, K y Gul, M. (2007). Effects of nicotine and vitamin E on glutathione reductase activity in some rat tissues in vivo and in vitro. *Elsevier*, 92-97.
- Estrada, J., & Pumachagua, R. (2007). Determinación de la nicotina es cigarrillos aplicando la técnica de la segunda derivada. *Rev Soc Quím Perú*, 73(2), 94-103.
- Everitt, B y Palmer, C. (2011). *Enciclopedia Companion to Medical Statistics* (2 ed.). United Kingdom : Wiley.
- García Moran, G., García Cardona, A., Ramón Mejía, O., Clavijo Grimaldi, D., Hernández Vela, S., Báez Biol, A., & Cobos, C. (2006). Aspectos bioclínicos y patobiológicos de la Vitamina C en la especie humana. *Rev CES Med*, 20(2), 53-72.
- García, G., Cobos, C., Rey, C., Mejía, O., Casariego, C., Clavijo, D., . . . Hernández, S. y. (2006). Biología, patobiología y bioclínica de la actividad de oxidorreducción de la vitamina C en la especie humana. *Universitas Médica*, 47(4), pp. 349-363.
- García, G; Cobos, C; Rey, C; Mejía, O; Casariego, C; Clavijo, D; García, A; Hernandez, S y Báez, S. . (2006). Biología, patobiología y bioclínica de la actividad de oxidorreducción de la vitamina C en la especie humana. *UNIVERSITAS MÉDICA*, 349-363.
- Gause, G. (1941). Analysis of various biological processes by the study of the differential action of optical isomers. *Biodynamica*, 217-246.
- Grégory, A., García, M., Ananías, G., Cardona, Ó., Mejía, R., Clavijo, D., . . . Cobos, C. (2006). Aspectos bioclínicos y patobiológicos de la vitamina C en la especie humana. *Rev CES Med*, 20(2), 53-72.
- Halliwell B. y Gutteridge. J. (1998). *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford SciencePublications(3er ed), 936 pp.
- Hatchell, P. y. (1980). The Influence of Genotype and Sex on Behavioral Sensitivity to Nicotine in Mice. *Psychopharmacology*, 45-49.
- Hebling, J; Bianchi, L; Basso, F; Scheffel, D; Soares, D; Carrilho, M; Pashley, D; Tjäderhane, L y de Souza, C. (2015). Cytotoxicity of dimethyl sulfoxide (DMSO) in direct contact with odontoblast-like cells. *Elsevier*, 399-405.
- Heusch, W., & Maneckjee, R. (1998). Signalling pathways involved in nicotine regulation of apoptosis of. *Carcinogenesis*, 19(4), 551-556.

- Heusch, W., & Maneckjee, R. (1998). Signalling pathways involved in nicotine regulation of apoptosis of human lung cancer cells. *Carcinogenesis*, 19(4), 551-556.
- Hoffmann, D y Horffmann, I. (1998). *Cancer Control*. Retrieved 05 07, 2015, from Smoking and Tobacco Control Monograph No. 9:
http://cancercontrol.cancer.gov/Brp/tcrb/monographs/9/m9_3.pdf
- Holloszy, J. (1998). Longevity of exercising male rats: effect of an antioxidant supplemented diet. *Elsevier*, 211-219.
<http://flymove.uni-muenster.de/>. (n.d.).
- Jacob, S., & Herschler, R. (1986). Pharmacology of DMSO. *CryoBiology*, 23, 14-27.
- López, A. (2003). *Estudio de la inestabilidad genómica espontánea e inducida en mutantes deficientes de la reparación del DNA de Drosophila melanogaster*. Barcelona, España: Univesidad Autónoma de Barcelona .
- Massie, H; Baird, M y Piekieniak, M . (1976). Ascorbic acid and longevity in Drosophila. *Experimental gerontology*, 37-41.
- Massie, H; Shumway, M; Whitney, S; Sternick, S y Aiello, V. (1991). Ascorbic acid in Drosophila and changes during aging. *Exp Gerontol*, 487-94.
- Massie, H; Williams, T y Iodice, A. (1985). Influence of Anti-inflammatory Agents on the Survival of Drosophila. *Journal of Gerontology* , 257-260.
- Nazir, A; Mukhopadhyay, I; Saxena, D y Kar, D . (2003). Evaluation of the No Observed Adverse Effect Level of Solvent Dimethyl Sulfoxide in Drosophila melanogaster. *Toxicology Mechanisms and Methods*, 147-152.
- NetQuímicaOrgánica. (2012, diciembre 02). Compuestos orgánicos importantes: Nicotina. Oviedo, España.
- Osorio, J. (2010). Citocromo P450 2A6 (CYP2A6) Humano y su relación. *Biosalud*, 9(1), 36 - 46.
- Osorio, J. (2010). Citocromos P450 2A6 (CYP2A6) humano y su relación con el humo del tabaco. *Biosalud*, 9(1), 36-46.
- Pallauf, K., Bendall, J., Scheiermann, C., Watschinger, K., Hoffmann, J., & Roeder, T. y. (2013). Vitamin C and lifespan in model organisms. *Food and Chemical Toxicology*, 255–263.
- Petitpierre, E. (1997). Drosophila y otros insectos en en la investigación genética. *Biol. S.E.A*(20), 401-403.
- Plant, N. (2003). *Molecular Toxicology*. New York: BIOS Scientific Publishers.
- Portales, U. D. (1982, mayo). *Creces, Ciencia y Tecnología*. Retrieved from
<http://www.creces.cl/new/index.asp?imat=%20%20%3E%20%2047&tc=3&nc=5&art=417>
- Reaume, A., & Knecht, D. y. (1991). The rosy Locus in Drosophila melanogaster: Xanthine Dehydrogenase and Eye Pigments. *Genetics Society of America*, 1099-1109.

- Repetto, M. (1997). Toxicología fundamental. Madrid , España: Días de Santos.
- Rocha, L. (2013). *La vejez en movimiento: Un enfoque integral*. Dunken.
- Rodriguez, K. y. (1999.). Estrés oxidativo y envejecimiento. *Rev. Cubana Invest Biomed*, 18(2), 67-76.
- Rosencrans, J. (1971). Effects of nicotine on brain area 5-hydroxytryptamine funcion in male and female rats separated of differences of activity . *European journal of pharmacology* , 123-127.
- Rosencrans, J. (1972). Brain area nicotine levels in male and female rats with different levels of spontaneous activity. *Neuropharmacology*, 863-870.
- Sadowska, I. y. (2014). Effect of Antioxidants Supplementation on Aging and Longevity. *BioMed Research International*, 90-236.
- Santos, N; Figueira-Coelho, J; Martins-Silva, J y Saldanha, C. (2003). Multidisciplinary utilization of dimethyl sulfoxide:pharmacological, cellular, and molecular aspects. *Elsevier*, 1035–1041.
- Schulz, T., Zarse, K., Voigt, A., & Urban, N. B. (2007). Glucose Restriction Extends Caenorhabditis elegans Life Span by Inducing Mitochondrial Respiration and Increasing Oxidative Stress. *CelPress*, 280-293.
- Segura, G. (2011, mar 15). *Sott.net, signs of the times*. Retrieved from <http://es.sott.net/article/4995-DMSO-solucion-milagrosa-y-un-antidoto-para-el-envenenamiento-por-radiacion>
- Selman, C., MacLaren, J., Meyer, C., Duncan, J., Redman, P., Collins, A., & Duthie, G. y. (2006). Life-long vitamin C supplementation in combination with cold exposure does not affect oxidative damage or lifespan in mice, but decreases expression of antioxidant protection genes. *Elsevier*, 897-904.
- Selman, C., McLaren, J., Collins, A., & Duthie, G. y. (2013). Deleterious consequences of antioxidant supplementation on lifespan in a wild-derived mammal. *Biol Lett*.
- Shaw, M; Mitchell, R y Dorling, D. (2000, Enero). *BMJ*. Retrieved Abril 29, 2015, from <http://www.bmj.com>
- Shibamura, A., & Ikeda, T. y. (2009). A method for oral administration of hydrophilic substances to Caenorhabditis elegans: Effects of oral supplementation with antioxidants on the nematode lifespan. *Elsevier*, 652-655.
- Simsek, E; Aydemir, E y Fiskin, K. (2012). DMSO exhibits similar cytotoxicity effects to thalidomide in mouse breast cancer cells. *Oncology letters*, 927-929.
- Taiz,L y Zeiger, E. (2006). Fisiología Vegetal. Universitat Jaume I.
- Tappel, A., & Fletcher, B. y. (1973). Effect of antioxidants and nutrients on lipid peroxidation fluorescent products and aging parameters in the mouse. *Journal of gerontology* , 415-424.

- Trinh, K; Andrews, L; Krause, J; Hanak, T; Lee, D; Gelb, M y Pallanck, L. (2010). Decaffeinated Coffee and Nicotine-Free Tobacco Provide Neuroprotection in Drosophila Models of Parkinson's Disease through an NRF2-Dependent Mechanism. *The journal of Neuroscience*, 5525-5532.
- Vázquez-Gómez, G; Sánchez-Santos, A; Vázquez-Medrano, J; Quintanar-Zúñiga, R; Monsalvo-Reyes, A; Piedra-Ibarra, E; Dueñas-García, I; Castañeda-Partida, L; Graf, U y Heres-Pulido, M. (2010). Sulforaphane modulates the expression of Cyp6a2 and Cyp6g1 in larvae of the ST and HB crosses of the Drosophila wing spot test and is genotoxic in the ST cross. *Elsevier*, 3333-3339.
- Veurink, G., Liu, D., Taddei, K., Perry, J., Smith, M., Robertson, T., . . . Atwood, C. y. (2003). Reduction of inclusion body Pathology in ApoE-Deficient. *ELSEVIER*, 34(8), 1070-1077.
- Wright, S., Zhong, J., & Zheng, H. y. (1993). Nicotine inhibition of apoptosis suggests a role in tumor. *The Faseb journal*, 7(11), 1045-1051.
- Zentella, M. y. (1995). Papel fisiológico de los radicales libres. *Educación biológica de bioquímica*, 152-161.
- Zhi-Wu, Y y Quinn, P. (1994). Dimethyl Sulphoxide: A Review of Its Applications in Cell Biology. *Biociencia reports*, 259-281.