



**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
IZTACALA**

Evaluación del efecto del Resveratrol en co-tratamiento con
Nicotina en SMART en ala de *Drosophila melanogaster*
Meigen, 1830 (Diptera Drosophilidae), CE

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:

BRENDA GÓMEZ LOZA

**DIRECTORA DE TESIS:
M en C. Irma Elena Dueñas García
2017**





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

“Para valorar la ciencia es preciso, ante todo,
sentir la alegría de la sabiduría”

Ralph Waldo Emerson

In memoriam a **Fernando G. Gómez E.**, mi mejor amigo, mi guía,
mi cómplice, mi consejero, mi gran apoyo y mi papá.
Te amo, te adoro y te extraño con toda el alma.

A mi mamá, **Gloria Loza P.**, mi mejor amiga, mi confidente,
mi otro gran apoyo y la mejor consejera del mundo.
Te amo, mami.

Agradecimientos

A **mis padres** por apoyarme siempre en cada decisión y paso que doy, por impulsarme a ser mejor en lo que hago y enseñarme que no importa el qué dirán siempre y cuando esté en paz y alegría con lo hago. Gracias por nunca dejarme sola.

A mis hermanos, **Fernando y Laura**, gracias por soportarme este tiempo con mi ñoñez, ¡los adoro, chicos!!!

A mi gran amiga, **Lore**, con quien he crecido desde niñas, gracias por apoyarme con tus consejos y sermones, eres como mi hermana.

A mis compañeros del **grupo 51**, son parte de mi segunda familia. Gracias por todos los momentos increíbles que pasé en su compañía. **Cris, Majo, Eiza, Rozz**, gracias por las pláticas, las risas y los consejos. **Kary, Dianita, Luis, Rafo, Robert**, gracias por también estar ahí cuando los necesité, gracias por escucharme y por los buenos momentos también. ¡Los adoro a todos!! **Ángel**, quiero decir que siempre fuiste como un hermano para mí y donde que quiera que estés, te extraño.

A otra parte de esa segunda familia, mis compañeros de laboratorio, **Luis, Bertha, Ángeles, Sonia, Miguel, Itza, Fanny, Ximena y Mauro** por todo el *bullying* y los buenos momentos compartidos dentro y fuera del laboratorio, así como en los congresos.

Y, también, a demás amigos y familia, que me han apoyado con gran cariño en cada decisión tomada como lo fue cuando cambié de carrera para hacer lo que realmente en la vida. Gracias, infinitas.

Agradecimientos

A la **Universidad Nacional Autónoma de México**, por ser mi segundo hogar, aunque pasara más tiempo en las aulas que en mi casa; por todos los apoyos brindados para que los objetivos de mi educación hayan sido alcanzados. Es un gran orgullo formar parte de la máxima casa de estudios.

A mi asesora, la profesora **Irma**, y profesoras **Maru** y **Laura** quienes fueron mi mamá y mis tías académicas, respectivamente. Gracias por todos los apoyos y oportunidades que me brindaron, así como los consejos, apapachos y sermones cuando ameritaban. No tengo palabras para decir cuánto significan para mí todas las atenciones que tuvieron conmigo.

Al **Dr. Ricardo Mejía** y al **Dr. Jaime Barral**, por su participación en el comité revisor de esta tesis. Gracias por sus aportaciones.

Al **Biól. Luis Barbo** y a **Ferchis** quienes me supervisaron y ayudaron durante el proceso de extracción y análisis de los componentes encontrados en el cigarrillo y en la colilla.

Al profesor **Ángel Durán** por apoyarme en los análisis estadísticos de este trabajo.

A **Luis** quien realizó los experimentos y análisis de la DMN.

A **Mauro** por prestarme sus pulmones al fumar los cigarrillos para que se pudiera llevar a cabo la extracción de las colillas de cigarrillos consumidos. Espero no haberte causado un daño genotóxico después de esto.

A **Rodolfo** por su colaboración en algunos datos, laminillas y experimentos.

Y a la **compañía de focos para microscopios**. Perdón por haberme acabado la reserva que teníamos en el laboratorio.

Al fin soy un elfo libre...

Índice

Índice de Tablas.....	III
Índice de Figuras	IV
Resumen	1
Introducción.....	2
Radicales libres, estrés oxidante y antioxidantes	4
Nicotina.....	6
Metabolismo de NIC en humanos	9
Principio de acción en <i>D. melanogaster</i>	11
Nicotina como neuroprotector y su efecto anti-apoptótico (<i>Antecedentes</i>)	12
<i>Nicotina como genotóxico</i> (<i>Antecedentes</i>).....	15
Resveratrol.....	16
<i>Efectos del resveratrol</i> (<i>Antecedentes</i>).....	17
Metabolismo del RES	23
<i>Drosophila melanogaster</i>	25
SMART en ala de <i>D. melanogaster</i>	26
Marcadores observables en el ala de <i>D. melanogaster</i>	27
Tipos de clones (manchas)	29
Justificación.....	33
Hipótesis	33
Objetivos.....	33
General:	33
Particulares:.....	33
Materiales y Métodos	34

Biológicos.....	34
Medios.....	34
Químicos.....	35
Propagación de las cepas.....	35
Cruza Estándar (CE) (<i>flr³</i> /TM3, <i>Bd^S</i> X <i>mwh/mwh</i>).....	36
Diseño experimental.....	37
Resultados.....	39
Discusión.....	55
Conclusiones.....	62
Anexo 1: Metabolismo Xenobiótico.....	64
Anexo 2: Análisis de tres cigarros comerciales de tabaco con colilla en espectrometría de masas.....	68
Cálculo de gramaje a partir de los resultados del análisis de espectrometría de masas.....	70
Anexo 3: Ciclo de Vida de <i>Drosophila melanogaster</i>	72
Anexo 4: Medio de Levadura Fresca Activada.....	75
Anexo 5: Análisis Estadístico.....	78
Literatura citada.....	81

Índice de Tablas

Tabla 1. Concentraciones de NIC en distintos productos comerciales	8
Tabla 2. Efecto neuroprotector de la NIC	13
Tabla 3. Efecto anti-apoptótico de la NIC	14
Tabla 4. Efecto genotóxico de la NIC	15
Tabla 5. Contenido de RES en diferentes alimentos.	17
Tabla 6. Efecto quimiopreventivo de RES	18
Tabla 7. Efecto anti-proliferativo del RES	18
Tabla 8. Efecto pro-oxidante de RES.....	20
Tabla 9. Efecto genotóxico de RES.....	20
Tabla 10. Diseño Experimental	38
Tabla 11. Resumen de los resultados obtenidos en el ensayo en ala de <i>D. melanogaster</i> (SMART).	41
Tabla 12. Peso de la colilla y tabaco de 3 marcas comerciales.....	69
Tabla 13. Cálculo de las cantidades de NIC por cada muestra.	70
Tabla 14. Cálculo de NIC por gramo de Cigarro	71
Tabla 15. Porcentaje de NIC a la que está expuesta una persona fumadora activa o pasiva durante la consumo del cigarrillo.	71

Índice de Figuras

Fig. 1. Los antioxidantes contrarrestan los daños provocados por los radicales libres.	5
Fig. 2. Estructura química de la NIC (Pinner y Wolffenstein, 1893).....	6
Fig. 3. Fuentes de consumo de la NIC.....	8
Fig. 4. Cuadro modificado de Vainio (2000) de las principales vías del metabolismo de la NIC.	10
Fig. 5. Principales vías de metabolismo de la NIC en <i>D. melanogaster</i>	12
Fig. 6. Estructura del RES (Takaoka, 1939).....	16
Fig. 7. Metabolismo del RES en humano	24
Fig. 8. <i>D. melanogaster</i>	26
Fig. 9. A. Marcador <i>mwh</i> ; B. Marcador silvestre.....	29
Fig. 10. Marcador <i>flare</i>	29
Fig. 11. ARRIBA: Evento normal en el que no se pierde la heterocigosis, los tricomas presentan un fenotipo silvestre. ABAJO: Deleción, se pierde uno de los marcadores dominantes (perdiendo la heterocigosis) dando como resultado una mancha <i>mwh</i> que es grande si el evento ocurre en las primeras divisiones de las células del disco imaginal.	30
Fig. 12. ARRIBA. Mutación puntual. ABAJO. No disyunción.	31
Fig. 13. Recombinación en células somáticas..	32
Fig. 14. Estimado de la sobrevivencia de organismos emergidos después de la aplicación de los tratamientos y sus disolventes, Agua milli-Q para NIC y EtOH1% para los co-tratamientos.	39
Fig. 15. Frecuencia de clones pequeños, grandes gemelos y totales por individuo de los testigos NIC.	42
Fig. 16. Frecuencia de manchas pequeñas, grandes, gemelas y totales de los co-tratamientos NIC [0.456, 1.9, 3.8 y 11.4mM] + RES [0.28 μ M] contra el testigo EtOH 1%.	43
Fig. 17. Frecuencia de manchas pequeñas, grandes, gemelas y totales de los co-tratamientos NIC [0.456, 1.9, 3.8 y 11.4 mM] + RES [11 μ M] contra el testigo EtOH 1%.	43

- Fig. 18. A. Distribución del tamaño de los clones *mwh* obtenidos con los tratamientos con los disolventes, de acuerdo al número de células mutadas en una mancha. B. Comparación de las frecuencias acumuladas de los clones *mwh* entre los disolventes44
- Fig. 19. A. Distribución del tamaño de los clones *mwh* de los testigos NIC contra su disolvente, de acuerdo al número de células mutadas en una mancha. B. Comparación de las frecuencias acumuladas de los clones *mwh* entre éstos.46
- Fig. 20. A. Distribución de clones *mwh* de los co-tratamientos RES 0.28 μM + NIC contra su disolvente, de acuerdo al número de células mutadas en una mancha. B. Comparación de la frecuencia acumulada de clones de éstos.47
- Fig. 21. A. Distribución de clones *mwh* de los co-tratamientos RES 11 μM + NIC contra su disolvente, de acuerdo al número de células mutadas en una mancha. B. Comparación de la frecuencia acumulada de clones de éstos.48
- Fig. 22. A. Distribución de clones *mwh* de los co-tratamientos RES [0.28 y 11 μM] + NIC 0.456 μM contra su respectivo testigo de NIC, de acuerdo al número de células mutadas en una mancha. B. Comparación de la frecuencia acumulada de clones de éstos.....49
- Fig. 23. A. Distribución de clones *mwh* de los co-tratamientos RES [0.28 y 11 μM] + NIC 1.9 μM contra su respectivo testigo de NIC, de acuerdo al número de células mutadas en una mancha. B. Comparación de la frecuencia acumulada de clones de éstos.50
- Fig. 24. A. Distribución de clones *mwh* de los co-tratamientos RES [0.28 y 11 μM] + NIC [3.8 μM] contra el respectivo testigo de NIC, de acuerdo al número de células mutadas en una mancha. B. Comparación de la frecuencia acumulada de clones de éstos.....51
- Fig. 25. A. Distribución de clones *mwh* de los co-tratamientos RES [0.28 y 11 μM] + NIC [11.4 μM] contra su respectivo testigo de NIC, de acuerdo al número de células mutadas en una mancha. B. Comparación de la frecuencia acumulada de clones de éstos.....52

Fig. 26. A. Distribución de clones <i>mwh</i> de los co-tratamientos RES 0.28 μ M + NIC contra el respectivo testigo de RES, de acuerdo al número de células mutadas en una mancha. B. Comparación de la frecuencia acumulada de clones de éstos.....	53
Fig. 27. A. Distribución de clones <i>mwh</i> de los co-tratamientos RES 11 μ M + NIC contra su respectivo testigo de RES, de acuerdo al número de células mutadas en una mancha. B. Comparación de la frecuencia acumulada de clones de éstos.....	54
Fig. 28. Esquema propuesto de las reacciones ocurridas en el organismo durante su exposición al co-tratamiento de NIC, RES y NIC + RES.	61
Fig. 29. Panorama general de las posibles rutas que puede tener un agente xenobiótico dependiendo de su polaridad.	67
Fig. 30. Muestras de tres marcas de cigarros en metOH grado HPLC, las colillas del producto consumido (izq.) y el producto sin consumir (der.) .	69
Fig. 31. Ciclo de vida de <i>D. melanogaster</i>	73
Fig. 32. Esquema de la larva de <i>D. melanogaster</i> mostrando los discos imaginales que darán forma a sus respectivas estructuras.	74
Fig. 33. Medio de levadura fresca activada terminado.	76
Fig. 34. Colocación del medio de levadura en los frascos de cultivo.....	76

Resumen

Algunos efectos adversos del consumo de la nicotina (NIC) son el aumento de radicales libres y el incremento en la incidencia de cáncer de páncreas. Por otra parte, el resveratrol (RES) es un antioxidante terapéutico y quimiopreventivo, que modula algunas rutas celulares asociadas con el daño provocado por radicales libres. El objetivo de este trabajo fue evaluar in vivo el efecto del RES ante NIC, con SMART en ala de *Drosophila melanogaster*. Hembras vírgenes *flr³/TM3, Bd^S* se cruzaron con machos *mwh/mwh* para obtener la cruce estándar (CE). Por triplicado y en tres experimentos independientes larvas de 72±4h fueron alimentadas crónicamente con RES [0.28, 11 µM] disuelto en etanol 1%; NIC [0.456, 1.9, 3.8, 11.4 mM] disuelta en agua mili-Q, co-tratamientos RES/NIC y testigos: agua mili-Q y etanol 1% (disolventes), DMN [74µM] (positivo). Se revisaron las alas de 704 individuos trans-heterocigotos, y los resultados se analizaron con el programa estadístico SMART PC versión 2.1 y la prueba U de Mann-Whitney y Wilcoxon. Los resultados indicaron que la NIC fue genotóxica únicamente a [11.4 µM] y tuvo un efecto concentración-respuesta en la toxicidad. Mientras que RES [0.28 µM] en co-tratamientos con NIC [0.456 y 1.9 mM] aumentó la frecuencia de clones mutantes. Por otra parte, RES [11 µM] protegió del daño tóxico producido por NIC [0.456, 1.9, 3.8, 11.4 mM] y de la genotoxicidad causada por NIC [11.4 µM], sin embargo, incrementó la frecuencia de manchas gemelas y aumentó la genotoxicidad en las concentraciones de NIC [0.456, 1.9 y 3.8 mM] mostrando un efecto modulador. Se encontraron diferencias en la distribución de clones *mwh* en todos los tratamientos, excepto con NIC [0.456 y 1.9 mM]. RES mostró ser un modulador de los efectos de NIC. RES disminuyó la mortalidad de NIC. RES [0.28 µM] aumentó el daño genotóxico de NIC [1.9 y 11.4 mM], mientras que RES [11 µM] resultó ser recombinante y en co-tratamiento con NIC [0.456, 1.9 y 3.8 mM] aumentó el daño, mientras que hubo una protección con NIC [11.4 mM]. Se concluye que es muy importante mantener el balance entre ambos compuestos para que el antioxidante pueda tener un efecto protector.

Palabras clave: drosophila, nicotina, resveratrol, genotoxicidad, modulación

Introducción

“Cuando encuentres lo hermoso de un tema,
dedícale toda tu vida”

A. Heyting

El cáncer es, actualmente, uno de los problemas de salud más importantes ya que representa una de las principales causas de muerte a nivel mundial (OMS, 2014). Se entiende por cáncer al crecimiento anormal de células somáticas causado por la alteración en la expresión de genes relacionados con la división celular y/o la apoptosis, generando un desbalance entre la proliferación y la muerte celular (Ruddon, 2007).

Una causa de estas alteraciones es la exposición a agentes xenobióticos que afectan al DNA mediante el estrés oxidante (generando radicales libres) o que son mutagénicos bajo ciertas condiciones, al ser activados por el metabolismo xenobiótico (Anexo 1) ya que su acción depende de su intensidad y de la duración del estrés; uno de los más importantes factores de riesgo de cáncer es el consumo de tabaco (Ruddon, 2007; Crespo-Santiago, 2006; OMS, 2014) cuyos componentes pueden ser biotransformados con los consecuentes riesgos de ser genotóxicos.

El tabaco está compuesto de una gran variedad de constituyentes los cuales son conocidos por contribuir al riesgo de padecer cáncer (Kleinsasser *et al.*, 2005; Gutiérrez-Maydata, 2003), su consumo es uno de los factores de riesgo más importante ya que es la causa del 20% de las muertes por cáncer a nivel mundial (OMS, 2014).

Uno de los componentes del tabaco son los alcaloides, entre ellos está la nicotina que constituye entre 85-95% del total de los alcaloides (*International Agency for Research on Cancer, 2007*). La nicotina (NIC), que también se encuentra mayoritariamente en el humo del cigarro, favorece el estrés oxidante en las células (Lozada y Rueda, 2010; Gutiérrez-Maydata, 2003), ya que provoca una producción muy alta de radicales libres, así como las especies reactivas de oxígeno (ROS) (Valavanidis *et al.*, 2009).

Si bien el estrés oxidante se da por el consumo de ciertos compuestos químicos, también se produce por una deficiente defensa antioxidante endógena (Boticario-Boticario y Cascales-Angosto, 2008), por lo que, una de las alternativas de prevención del cáncer es el uso de antioxidantes exógenos, los cuales actúan como defensa contra los daños al DNA causados por el estrés oxidante provocado por diferentes agentes, tales como el tabaco (Borek, 1997; Challem y Block, 2008).

Actualmente, el resveratrol (RES) es considerado como uno de los antioxidantes usados en la prevención del envejecimiento, pero también como un candidato terapéutico y quimio-preventivo contra la carcinogénesis, debido a su capacidad de modular múltiples rutas moleculares asociadas con el desarrollo y progresión del cáncer (Lin, 2006).

Dado que algunos efectos de la NIC se han relacionado con el estrés oxidante y que el RES se considera un antioxidante, se decidió evaluar con una prueba de genotoxicidad a ambos compuestos por separado y en co-tratamiento.

Para la evaluación de los efectos genotóxicos y/o antigenotóxicos de compuestos xenobióticos se llevan a cabo varias pruebas, entre ellas está la prueba de mutación y recombinación somática (SMART, por sus siglas en inglés *Somatic Mutation And Recombination Test*), la cual detecta la actividad mutagénica, clastogénica y/o de recombinación genética de genotoxinas y que se basa en la pérdida de heterocigosis de dos marcadores recesivos (*flr³* y *mwh*) que se expresan como tricomas anormales en las alas de *Drosophila melanogaster* (mosca de la fruta) (Graf *et al.*, 1984).

Radicales libres, estrés oxidante y antioxidantes

Los radicales libres son aquellas especies atómicas en la cuales existe un electrón desapareado, lo que les confiere una gran inestabilidad y, por consiguiente, las vuelve muy reactivas (Venereo-Gutiérrez, 2002); además, dada a su estructura molecular, “roban” electrones de otras moléculas de manera indiscriminada y las oxidan.

Éstos se producen por diversos mecanismos, como son una dieta hipercalórica, insuficiencia de antioxidantes, procesos inflamatorios y las reacciones de oxidación por el consumo, directo e indirecto, de compuestos que pueden presentar cierta toxicidad (por ejemplo, el humo del cigarro), produciendo daño celular al interactuar con las principales biomoléculas (o macromoléculas) del organismo (Mora, 2002; Venereo-Gutiérrez, 2002). A este daño se le conoce como estrés oxidante.

El estrés oxidante es el resultante de un excedente de radicales libres en el organismo y si éste es severo se producen daños en la célula o bien, la muerte celular (Mora, 2002).

Estos daños ocurren, principalmente, en los lípidos, las proteínas y ácidos nucleicos. En estos últimos se producen mutaciones que podrían llevar a la pérdida de expresión o síntesis de alguna proteína por daño a un gen específico (los cuales se inactivan o activan propiciando la formación de tumores cancerígenos), así como fragmentaciones, reordenamientos cromosómicos y desmetilación de citosinas (Venereo-Gutiérrez, 2002).

Para evitar el daño del estrés oxidante, el cuerpo utiliza los antioxidantes en su metabolismo. En términos coloquiales, un antioxidante es toda sustancia que previene el daño celular provocado por los radicales libres y el estrés oxidante. La función de los antioxidantes es fundamental en el organismo ya que donan electrones a los radicales libres (Challem, 2008). Como se puede ejemplificar en la Figura 1.

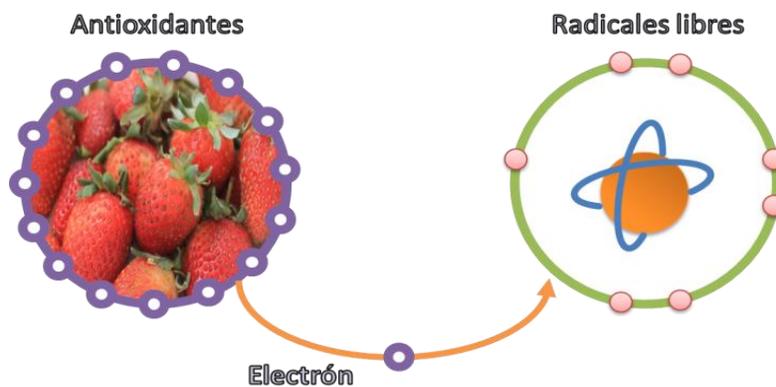


Fig. 1. Los antioxidantes contrarrestan los daños provocados por los radicales libres.

Nicotina

La NIC (Figura 2) es un alcaloide que actúa como bioinsecticida que se encuentra mayoritariamente en las hojas de la planta del tabaco (*Nicotiana tabacum*) y es un potencial adictivo al fumar, siendo mediado por receptores neuronales nicotínicos de acetilcolina (nAChRs) (Mai *et al.*, 2003; Dajas-Bailador y Wonnacott, 2004; Henningfield *et al.*, 2004). Estos receptores son un complejo de proteínas transmembranales que constituyen canales ionotrópicos y son responsables de la transmisión sináptica colinérgica en el sistema nervioso central (SNC) (Ali, 2012). Los nAChRs se encuentran tanto en mamíferos como en insectos, en estos últimos se encuentran en alta densidad dentro del tejido nervioso (Ihara *et al.*, 2007; Brown *et al.*, 2006).

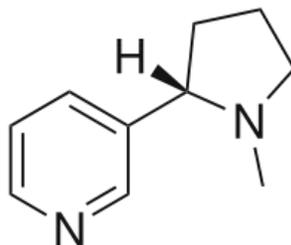


Fig. 2. Estructura química de la NIC (Pinner y Wolfenstein, 1893).

La importancia de la NIC radica en sus efectos adictivos, genotóxicos y cancerígenos, entre otros (Abel, 1986; Buckingham *et al.*, 2009).

Aunque el tabaco contiene muchas otras toxinas que han mostrado ser cancerígenas, como el benzo- α -pireno, la nicotina ha sido relacionada como

un factor importante en pancreatitis y, por consiguiente, cáncer de páncreas, ya que puede ejercer cierta influencia en las células inflamatorias de este órgano debido a la unión con la subunidad $\alpha 7$ de los nAChRs (Edderkaoui y Thrower, 2013). También se le ha vinculado con la proliferación de otros cánceres como el colo-rectal y el de pulmón, ya que se han observado nAChRs en células no neuronales cancerígenas (Egleton *et al.*, 2007).

Existen diversas vías de consumo de la NIC (Figura 3), entre las cuales varía también la concentración del alcaloide (Tabla 1). En el caso de los cigarrillos, la concentración de la NIC también varía dependiendo de la marca. Paralelamente a este trabajo, se realizó un estudio de espectrofotometría de masas en el cual se comparó la cantidad de la NIC de tres marcas de cigarrillos comerciales (Anexo 2).

De acuerdo con el estudio, se encontró que la NIC oscila entre 2.23 y 3.24 mg por cigarrillo, mientras que en la colilla se encontró entre 0.11 y 0.91 mg, por lo que, cada individuo, ya sea fumador activo o pasivo, está expuesto a un gran porcentaje (59-96%) de la NIC que se libera durante la combustión del cigarro.



Fig. 3. Fuentes de consumo de la NIC. A. Cigarro con filtro; B. Cigarros sin filtro; C. "Bidi" son cigarrillos hechos con tabaco seco triturado liado con una hoja seca de tabaco; D. Inhalador nasal con NIC; E. Cigarros electrónicos; F. Spray bucal con NIC; G. Chicles de NIC; H. Parches con NIC.

Tabla 1. Concentraciones de NIC en distintos productos comerciales

Producto comercial	Fuente	Concentración
Cigarro con filtro	(Malson <i>et al.</i> , 2001)	16.3 mg/g
	(Gómez-Loza <i>et al.</i> , 2017, no publicado)	3.76 – 5.66 mg/g
Cigarro sin filtro	(Malson <i>et al.</i> , 2001)	13.5 mg/g
"Bidi"	(Malson <i>et al.</i> , 2001)	21.2 mg/g
Chicle	Información en empaque	2 – 4 mg
Parche	Información en empaque	7 – 21 mg
Spray nasal	Información en empaque	10 mg/mL
Inhalador bucal	Información en empaque	10 mg/mL
Cigarros electrónicos	(Pagano <i>et al.</i> , 2015)	16-22 mg/mL

Metabolismo de NIC en humanos

El metabolismo de la NIC es complejo, ya que las concentraciones absorbidas dependen de varios factores, siendo el principal la forma de consumo (nasal, oral o cutáneo) (Benowitz *et al.*, 2009).

En el humano, se lleva a cabo en gran parte por la enzima citocromo P450 (CYP2A6) la cual transforma la nicotina en cotinina (Messina *et al.*, 1997; Malaiyandi *et al.*, 2006). Esta última es el biomarcador más ampliamente utilizado ya que puede medirse en la sangre, la orina, la saliva, el cabello o las uñas (Henningfield *et al.*, 2004; Malaiyandi *et al.*, 2006; Muliaty *et al.*, 2010). Se calcula que el 70-80% de la NIC es metabolizado en cotinina (Muliaty *et al.*, 2010).

La NIC también puede ser metabolizada en hidroxinicotina por este mismo citocromo (Benowitz *et al.*, 2009), y nornicotina por CYP82E4 (Siminszky *et al.*, 2005). También se metaboliza en otros metabolitos que forman parte de las principales vías de metabolismo de la NIC (Figura 4) (Vainio, 2000).

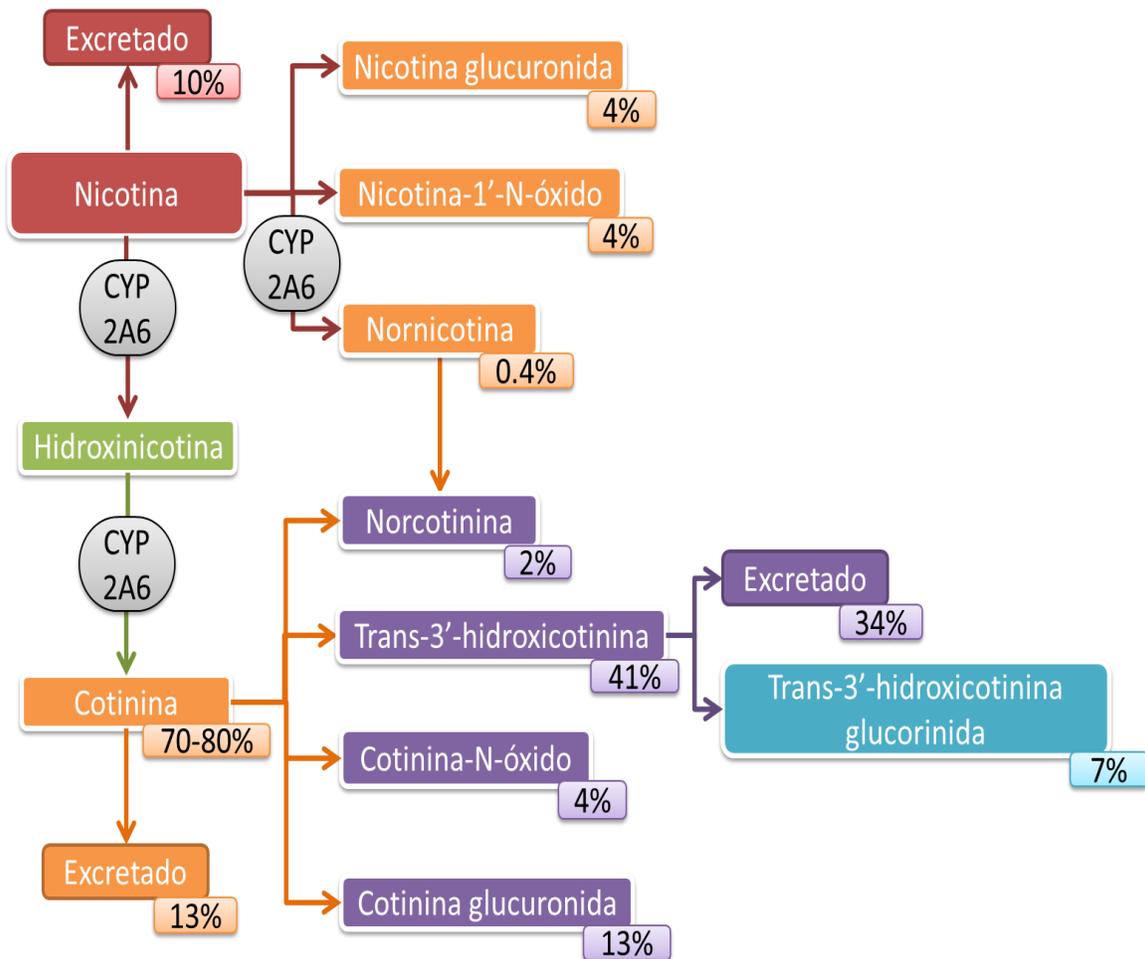


Fig. 4. Cuadro modificado de Vainio (2000) de las principales vías del metabolismo de la NIC. Naranja: metabolitos directos. Morados y Azules: metabolitos derivados. La hidroxicotina es el precursor de la cotinina. Los porcentajes son aproximados.

Principio de acción en *D. melanogaster*

Los insectos poseen en su sistema nervioso central (SNC) células Kenyon en las cuales la NIC actúa mediante dos rutas (Figura 5):

En la primera, dado que la NIC es dibásica por sus anillos de piridina (carga positiva e hidrofílica) y pirimidina (carga neutra y lipofílica) (Figura 2) (Gorrod y Jacob III, 2002), tiene la capacidad de penetrar la membrana celular, llegando al citoplasma y, una vez ahí, se ancla a los receptores nACh mitocondriales promoviendo un incremento de iones de Ca^{2+} , hiperpolarizando la membrana mitocondrial permitiendo la entrada de gran material citoplasmático ocasionando la ruptura de ésta y por consiguiente la muerte celular (Campusano *et al.*, 2007; Ivannikov y Macleod, 2013; Leyton *et al.*, 2014).

La segunda manera en que actúa la NIC es anclándose directamente sobre los nAChRs de la membrana de las células Kenyon, los cuales ionizan el nitrógeno de los anillos piridínicos e inhibe la acción de la acetil-colinesterasa (AChE), la cual está encargada de degradar a la acetil-colina (ACh) (Yamamoto y Casida, 1999). Dado que la AChE es inhibida, la concentración de ACh se incrementa en el espacio sináptico generando neurotoxicidad y la sobre estimulación del sistema nervioso central y muscular (Feiner *et al.*, 2011) lo que puede ocasionar convulsiones (Bettelheim *et al.*, 2010), provocando la muerte del organismo (Timbrell, 2002).

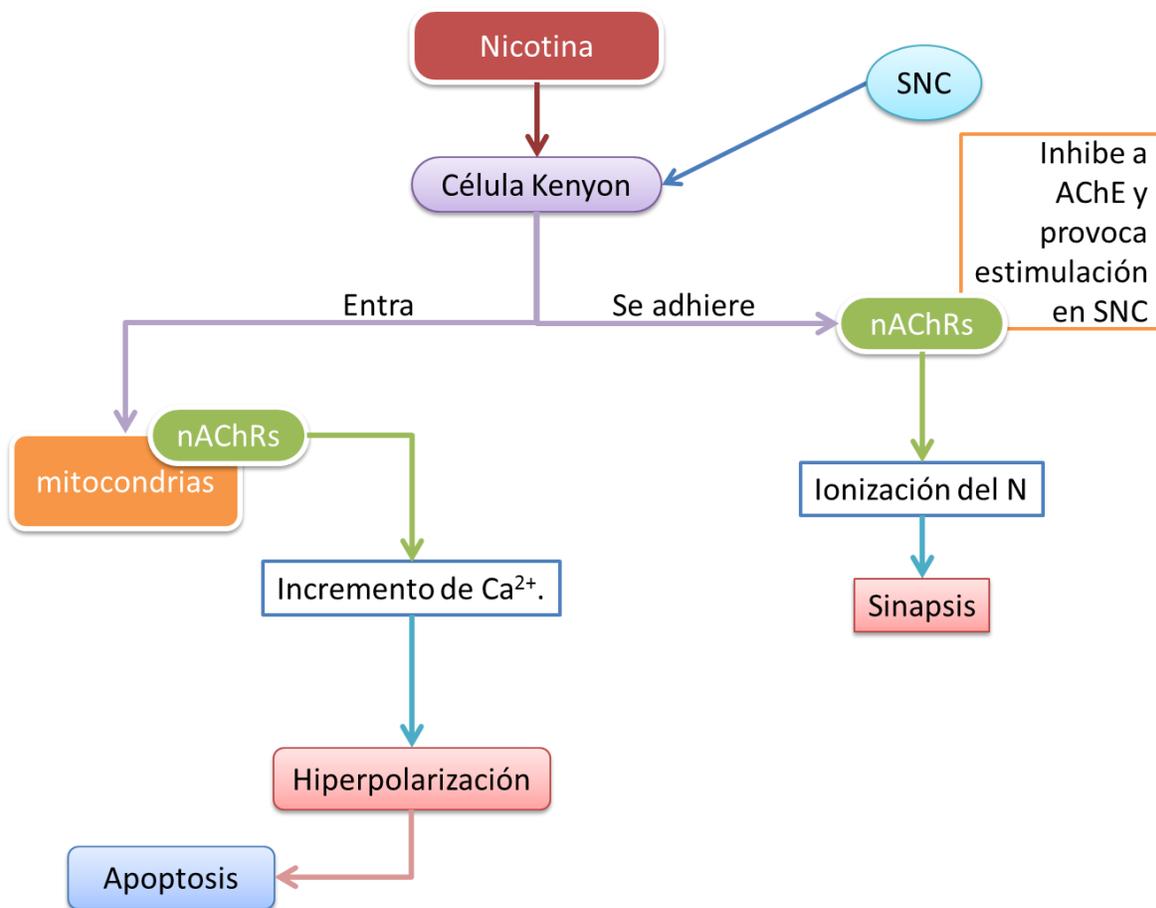


Fig. 5. Principales vías de metabolismo de la NIC en *D. melanogaster*. Esquema basado en (Yamamoto y Casida, 1999; Campusano *et al.*, 2007; Ivannikov y Macleod, 2013; Leyton *et al.*, 2014)

Nicotina como neuroprotector y su efecto anti-apoptótico (Antecedentes)

La NIC también ha mostrado efectos anti-apoptóticos (ver Tabla 3), los cuales han sido benéficos (en el caso de tratamientos contra el Alzheimer) (ver Tabla 2), pero también malignos (como la proliferación de células cancerígenas) (ver Tabla 4).

Tabla 2. Efecto neuroprotector de la NIC

Autor y Año	Ensayo	Resultados
Gentry y Lukas, 2002	Evaluación del incremento de nAChRs en pacientes de Alzheimer	La NIC promueve el incremento en la expresión de los AChRs tanto en el cerebro como en células cultivadas cuando éstas están expuestas a cierta concentración de la NIC.
Nuutinen <i>et al.</i> , 2006	Evaluación de la regulación del incremento	La NIC indujo a la regulación del aumento de nAChR en células SH-EP1 de humano, mostrando que la subunidad $\alpha 7$ (la cual ha mostrado tener efecto de neuroprotección) de estos receptores es mediada por cAMP y por la proteína-quinasa C (PKC).
Buckingham <i>et al.</i> , 2009	Revisión del rol de la NIC como neuroprotector	<p>La NIC tiene un efecto supresor de apoptosis en células neuronales.</p> <p>La NIC provoca una respuesta de sobrevivencia de manera general en las células.</p>

Tabla 3. Efecto anti-apoptótico de la NIC

Autor y Año	Ensayo	Resultados
<p><i>Wright et al., 1993</i></p>	<p>Evaluación del efecto de la NIC en células cultivadas expuestas a diferentes factores de estrés</p>	<p>La NIC, como agonista de sobrevivencia celular, inhibe la apoptosis inducida por varios procesos de estrés tales como el factor de necrosis tumoral, luz ultravioleta y fármacos quimioterapéuticos</p>
<p><i>Mai et al., 2003</i></p>	<p>Evaluación de la NIC en la fosforilación de Bcl2</p>	<p>La NIC indujo la fosforilación de Bcl2 generando una función anti-apoptótica.</p> <hr/> <p>La NIC, activa la fosfolipasa C (PLC), y ésta activa a los receptores ligados a la proteína G. Ambas activaciones inducen la fosforilación de Bcl2.</p>

Nicotina como genotóxico **(Antecedentes)**

La NIC además de ser un promotor de la proliferación de células neoplásicas, también es capaz de inducir genotoxicidad en las células, generando aductos y aberraciones cromosómicas, entre otras.

Tabla 4. Efecto genotóxico de la NIC

Autor y Año	Ensayo	Resultados
<i>Li et al., 1996</i>	Estudio de genotoxicidad de NIC y sus derivados por espectrometría de acelerador de masas en hámster chino.	La NIC formó aductos en el DNA directamente proporcionales a las diferentes concentraciones de NIC.
<i>Arboleda-Moreno et al., 2004</i>	Evaluación de la frecuencia de aberraciones cromosómicas (AC) en jóvenes colombianos fumadores y no fumadores.	La frecuencia de AC totales fue mayor en los jóvenes fumadores que en los que no fumaban. Se observó una relación entre dosis y efecto, demostrada por el aumento de la frecuencia de AC al aumentar la intensidad del consumo.
<i>Kleinsasser et al., 2005</i>	Evaluación de efecto genotóxico de la NIC en células de tejido linfático en prueba Cometa.	Daño en DNA de linfocitos por rupturas y daños en la reparación del DNA.

Resveratrol

El (RES) (Figura 6) es una fitoalexina que podemos encontrar en más de setenta plantas, principalmente en las uvas rojas (sobre todo en la piel), los arándanos, las moras y los cacahuates (Geisler, 2011) en los cuales se sintetiza en respuesta a factores de estrés como la exposición a la luz ultravioleta, infecciones fúngicas, así como daños físicos y cambios climáticos extremos (Geisler, 2011; King *et al.*, 2006). Otra fuente es el vino tinto (en concentraciones menores, en el vino blanco y el rosado) (Romero-Pérez *et al.*, 1996; Sherry-Chow *et al.*, 2010).

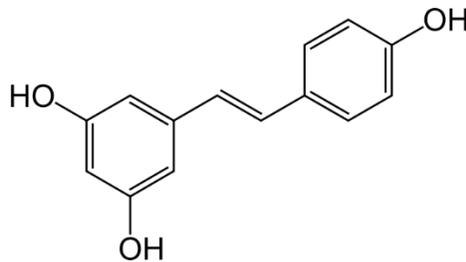


Fig. 6. Estructura del RES (Takaoka, 1939).

La concentración de RES en los alimentos depende de las condiciones de crecimiento de la planta (en el caso de las frutas) o de la producción del alimento (en el caso de alimentos procesados a partir de la fruta en cuestión) (Tabla 5).

Tabla 5. Contenido de RES en diferentes alimentos. [1] Linus Pauling Institute, 2015 ; [2] Sherry-Chow *et al.*, 2010; [3] Romero-Pérez *et al.*, 1996.

Alimento	Porción	Cantidad de RES
Uvas rojas ^{[1][2]}	1 taza (160 g)	0.24 – 1.25 mg
Vino tinto ^[2]	1 copa (5 oz)	0.29 – 1.89 mg
Vino blanco ^[3]	1 copa (5 oz)	0.00765 – 0.27 mg
Vino rosado ^[3]	1 copa (5 oz)	~ 0.3225 mg
Cacahuete ^[1]	1 taza (146 g)	0.01 – 0.26 mg
Crema de cacahuete ^[1]	1 taza (258 g)	0.04 – 0.13 mg

Efectos del resveratrol **(Antecedentes)**

El RES es considerado como un quimiopreventivo (Tabla 6), así como un buen candidato para la terapia en contra de la carcinogénesis (Tabla 7) y se han reportado estudios en los que además de mostrarlo como un excelente antioxidante se le atribuyen propiedades preventivas de enfermedades coronarias, del mismo modo que inhibe el crecimiento de células cancerosas, entre otras (Lin, 2006; Geisler, 2011; King *et al.*, 2006).

Sin embargo, existen trabajos reportados por Matsuoka (2001), Schmitt (2002), Silva (2013), Palacios (2014), entre otros, que encontraron un efecto pro-oxidante (Tabla 8) y genotóxico (Tabla 9) en el RES.

Debido a lo anterior, al auge que ha tenido el RES y al hecho de que ha sido considerado, comercialmente, como el elixir de “la eterna juventud” por algunas marcas como Revertrex (comercial en YouTube, Clave: Q1DJ_xAOKp0) o sitios web como (LCI Bogotá / LCI Barranquilla, 12 de Mayo 2011) o (ABC Salud, 22 de Diciembre de 2014), se han efectuado varios estudios *in vitro* e *in vivo* sobre sus efectos tanto anti-oxidantes como pro-oxidantes.

Tabla 6. Efecto quimiopreventivo de RES

Autor y Año	Ensayo	Resultados
Roy <i>et al.</i> , 2008	Evaluación <i>in vivo</i> del efecto quimiopreventivo en células dérmicas de ratones.	El co-tratamiento RES/DBMA (25-50 μ M/ 5 μ g) mostró una disminución en la formación de tumores.

Tabla 7. Efecto anti-proliferativo del RES

Autor y Año	Ensayo	Resultados
Potter <i>et al.</i> , 2002	Evaluación <i>in vitro</i> del metabolismo del RES por el citocromo P450 1B1 (CYP1B1) en células linfoblásticas.	Reportan la conversión del RES en piceatannol por el CYP1B1. El piceatannol reporta efectos antiproliferativos en células leucémicas.
Sala <i>et al.</i> , 2003	Evaluación <i>in vitro</i> en líneas de células cancerígenas de próstata.	El RES, convertido a piceatannol, inhibe el crecimiento celular.

		La estructura de la molécula es una característica crítica necesaria para inducir la inhibición del crecimiento celular.
Kubota <i>et al.</i> , 2003	Comparación de la efectividad del RES y paclitaxel sobre la proliferación y apoptosis en tres líneas de células de cáncer de pulmón.	El RES (5-10 μM) inhibió el crecimiento del 50% de las células (ED50).
		El RES (10 μM) mejoró los efectos antiproliferativos y apoptóticos del paclitaxel.
		Se propone al RES como una alternativa quimioterapéutica para el cáncer de pulmón.
Opipari <i>et al.</i> , 2004	Análisis de respuesta de cinco líneas de células de cáncer de ovario.	El RES (50 μM) inhibió el crecimiento celular e indujo a muerte celular (vía apoptosis o autofagia).
		Se sugiere al RES (50 μM) como un quimioterapéutico para tratar cáncer ovárico cuando las células cancerígenas no pueden ser inducidas a apoptosis.

Tabla 8. Efecto pro-oxidante de RES

Autor y Año	Ensayo	Resultados
Zheng <i>et al.</i> , 2006	Determinación de daño oxidante al DNA en la línea celular HL-60.	El RES (44 µg/mL) en presencia de Cu(II) indujo daño al DNA.
Martins <i>et al.</i> , 2013	Análisis del estrés oxidante en células hepáticas de murino.	Tratamientos de RES (0.1, 1, 10, 50 µM) aumentaron la producción de ROS en las células.
		El RES (50 µM) redujo la cantidad de células vivas.

Tabla 9. Efecto genotóxico de RES

Autor y Año	Ensayo	Resultados
Matsuoka <i>et al.</i> , 2001	Ensayo de aberraciones cromosómicas, micronúcleos y de intercambio de cromátides hermanas en células de pulmón de hámster chino.	El RES (2.5 – 20 µg/mL) produjo aberraciones cromosómicas estructurales y aneuploidías; indujo células micro- y polinucleadas en células expuestas a 48 horas de tratamiento.
		El RES (10 µg/mL) provocó un retroceso en el ciclo celular.

		El RES (2.5, 5, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) indujo intercambio de cromátides hermanas de manera dosis-dependiente
Schmitt <i>et al.</i> , 2002	Ensayo de micronúcleos en células de linfoma de ratón en células de hámster chino, células y en una línea de células cancerígenas de mama.	El RES indujo micronúcleos, desplazamiento de cromosomas metafásicos y toxicidad en células de linfoma de ratón.
		El RES indujo micronúcleos en células de hámster chino.
		El RES inhibió el crecimiento en línea de células cancerígenas.
Ahmad <i>et al.</i> , 2005	Análisis de daño al DNA en plásmidos	El co-tratamiento RES-Cu(II) incrementó el porcentaje de mutaciones por delección.
		El RES por sí solo también incrementó el porcentaje de mutación por delección.
		El co-tratamiento RES-Cu(II) (2.28 – 45.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$) aumentó la frecuencia de mutaciones.

Gómez-López, 2013	SMART en ala de <i>Drosophila melanogaster</i> . Cruza estándar	El RES (2.5, 10 y 20 µg/mL) presentó efectos genotóxicos. La más baja mostró el mayor efecto.
Silva-Calzada, 2013	SMART en ala de <i>Drosophila melanogaster</i> . En co-tratamiento con Uretano. Cruza estándar	El RES (10 µM) fue genotóxico y en co-tratamiento redujo el efecto genotóxico del uretano. Mientras que RES (43 y 172 µM) no presentó daño, pero en co-tratamiento con el uretano incrementó el daño producido por éste.
Palacios-López, 2014	SMART en ala de <i>Drosophila melanogaster</i> . En co-tratamiento con 4-NQO. Cruza estándar.	El RES (2.5 µg/mL) indujo un efecto genotóxico temprano. El RES no protegió del efecto genotóxico del 4-NQO, pero sí lo moduló.

Metabolismo del RES

El RES entra en el cuerpo humano, dentro del cual tiene una vida media que varía de 1 a 3 horas en una única ingesta, y 2 a 5 horas con una ingesta repetida (Almeida *et al.*, 2009).

La fitoalexina es absorbida vía gástrica e intestinal por difusión pasiva o facilitada en donde es metabolizada y transportada al hígado en forma de resveratrol trisulfato, resveratrol-3-O-glucurónico y RES libre, los cuales llegan al hígado (en el caso del RES en forma libre, puede entrar por difusión o haciendo un complejo con una albúmina o una lipoproteína) donde entran a la fase II del metabolismo y son conjugados con sulfatos y glucurónidos, y excretados en la orina en forma de los siguientes compuestos: resveratrol monosulfato, resveratrol monoglucurónico, monosulfato-hidro-resveratrol, monoglucurónico-hidro-resveratrol (Gambini *et al.*, 2015) (Figura 7).

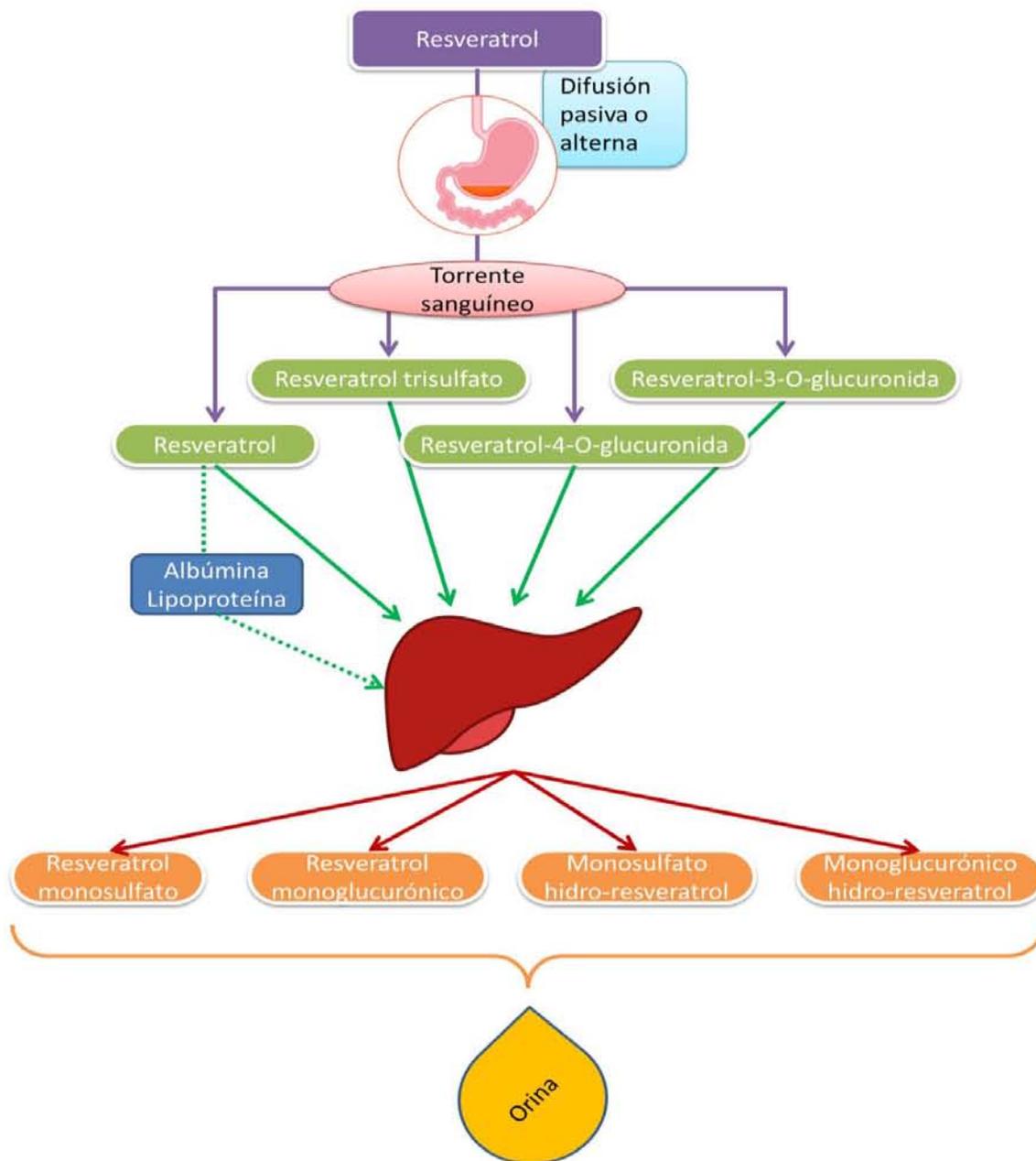


Fig. 7. Metabolismo del RES en humano de acuerdo con Gambini *et al.* (2015).

Drosophila melanogaster

En 1910, T.H. Morgan confirmó las leyes de la herencia empleando como modelo biológico la mosca de la fruta (*D. melanogaster*) (Figura 8), debido a que se puede obtener un alto número de descendencia (lo cual brinda también una alta representatividad estadística). También posee un ciclo de vida corto (ANEXO 3) que nos permite medir los efectos de la manipulación a la que se haya sido expuesta, en las siguientes generaciones en un corto tiempo, además de que su manutención es barata (Hauling, 2011).

El conocimiento obtenido en *D. melanogaster* podría aplicarse en el humano debido a la homología entre ambas especies, la cual permite extrapolar la información entre un sistema y otro (Li y Garza, 2003). Dado que las “instrucciones genéticas” son básicamente las mismas en ambos casos, la *Drosophila* ha demostrado ser capaz de dar respuestas incipientes a estas preguntas (Monesteir, 1999).

Este organismo es considerado como un modelo muy importante para la investigación en el rubro de salud humana y nanotoxicidad (Posgai, 2012). *D. melanogaster* es un modelo que puede emplearse en estudios genéticos debido a que su genoma ofrece una ventaja exclusiva de poder analizar todo un genoma completo, así como “mapear” los genes de interés, dentro de los cuales encontramos cerca de 580 genes relacionados a enfermedades humanas incluido el cáncer (Reiter *et al.*, 2001; Koh *et al.*, 2006; Posgai, 2012; Flybase, 2017).



Fig. 8. *D. melanogaster*. IZQ: Macho, presenta peines sexuales en primer par de apéndices, los tres últimos segmentos están fusionados, lo que le da una coloración oscura; DER: Hembra, más grande que el macho, no tiene segmentos abdominales fusionados, tampoco presenta peines sexuales.

SMART en ala de *D. melanogaster*

SMART es un bioensayo que surge a partir del interés sobre la co-relación entre la actividad mutagénica y recombinante en células somáticas y la actividad cancerígena de algunos agentes genotóxicos (Graf *et al.*, 1984).

Esta prueba está basada en la pérdida de heterocigosis (LOH, por sus siglas en inglés *Loss Of Heterozygosity*) en marcadores genéticos expresados en ojo y ala de *D. melanogaster* (Graf *et al.*, 1984; Dueñas-García, 2002), y puede ser vista como una conexión entre las pruebas *in vitro* e *in vivo* en mamíferos (Castañeda-Partida, 2002), además de que detecta promutágenos que requieren bioactivación (Frei *et al.*, 1998), así como actividad antigénica, probando con diferentes co-tratamientos (Graf *et al.*, 1984). Esta LOH

podría promover enfermedades genéticas recesivas heredables, así como la proliferación de neoplasias (Castañeda-Partida, 2002).

SMART en ala presenta ventajas como el montaje de preparaciones permanentes, las cuales pueden ser verificadas, o revisadas, incluso años después, también los organismos tratados pueden ser conservados en etanol al 70% para su posterior montaje en las preparaciones permanentes (Graf *et al.*, 1984). Otra ventaja es la de poder revisar una gran cantidad de células (25,000 células por ala, aproximadamente), por cada mosca tratada (Graf *et al.*, 1984).

La prueba consiste en exponer células indiferenciadas (presentes en los discos imaginales que darán origen a las alas) a un determinado compuesto o mezcla de compuestos, de producirse una mutación en alguna de las células, éstas, al dividirse, darían lugar a un clon mutado detectable en el ala (Graf *et al.*, 1984). Con esta prueba pueden detectarse cuatro tipos de mutación: mutación puntual, deleción, aneuploidía y recombinación en células somáticas (Guzmán-Rincón y Graf, 1995).

Marcadores observables en el ala de *D. melanogaster*

Para la realización de esta prueba se emplearon dos líneas: “multiple wing hairs” (*mwh/mwh*) y “flare” (*flr³/In(3LR)TM3, Bd⁵*), cuyos marcadores son los siguientes:



***mwh* (multiple wing hairs):** Marcador recesivo que se encuentra en el brazo izquierdo del Cromosoma 3 (3 – 0.3) (Flybase, 2017) y se caracteriza por presentar, como su nombre lo indica, tres o más tricomas por célula, cuando la expresión normal en un fenotipo silvestre es de uno por célula (Figura 9).



***flr³* (flare):** Marcador recesivo ubicado en el brazo izquierdo del Cromosoma 3 (3 – 38.8) (Flybase, 2017) y se expresa como tricomas malformados, como si hubieran sido quemados o si hubiesen apagado un cigarrillo encima de ellos (Figura 10). Es letal en homocigosis por lo que la cepa se mantiene gracias a una inversión triple denominada TM3 que impide la recombinación entre el par de cromosomas 3.



***Bd^S* (Beaded-Serratia):** Marcador dominante en el Cromosoma 3 (3 – 92.5) (Flybase, 2017) que se emplea para diferenciar el marcador flare del marcador Oregon flare (presente en las moscas de la otra cepa que se usa en el ensayo SMART) (Dueñas-García, 2002). Su nombre se debe a que las alas presentan “muecas” en su contorno. También es letal en homocigosis e igual que en flare TM3 impide la recombinación entre el par de cromosomas 3.



***In(3LR)TM3* (Inversion (3left, right) Third Multiple 3):** Dado que *flare* y *Beaded-Serratia* son letales en homocigosis, este marcador actúa como su balanceador para poder tener ambos marcadores letales en heterocigosis. Presenta tres inversiones: 2 paracéntricas (L y R) y una pericéntrica (L + R) (Dueñas-García, 2002).

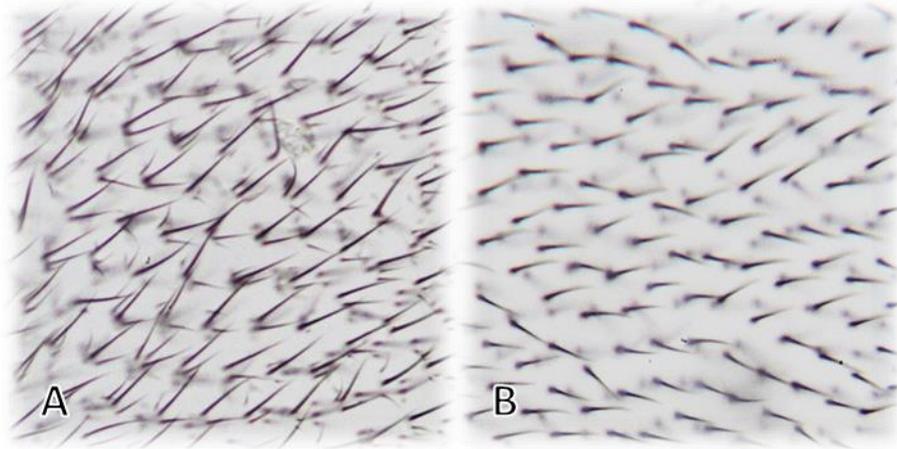


Fig. 9. A. Marcador *mwh*. Se forman múltiples tricomas a partir de una misma célula; B. Marcador silvestre donde se forma un tricoma por célula.

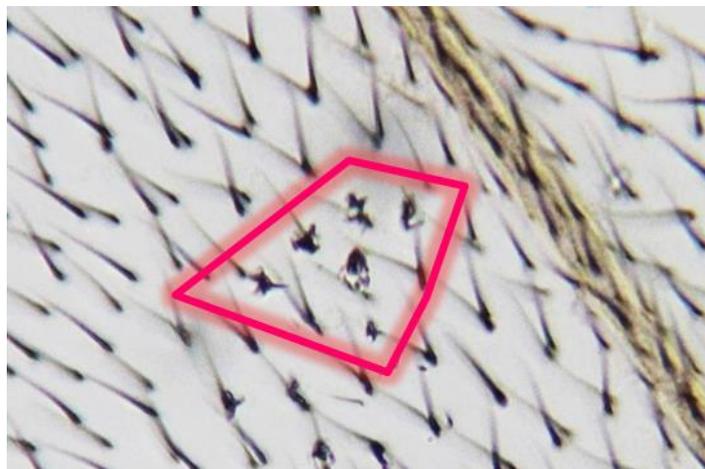


Fig. 10. Marcador *flare*. Los tricomas presentan F-actina mal formada porque ésta se desensambla.

Tipos de clones (manchas)

LOH se puede dar por varios eventos los cuales se ven en la expresión de clones (o manchas) de los marcadores recesivos (*flare* o *mwh*) o clones al perder el alelo dominante (silvestre). Estos eventos pueden ser delección (Figura 11),

no disyunción (Figura 12), mutación puntual (Figura 12) y recombinación en células somáticas (Figura 13), dando como resultado manchas simples pequeñas (1 ó 2 células) y grandes (de 3 o más células) o manchas gemelas (la expresión de ambos marcadores en células adyacentes).

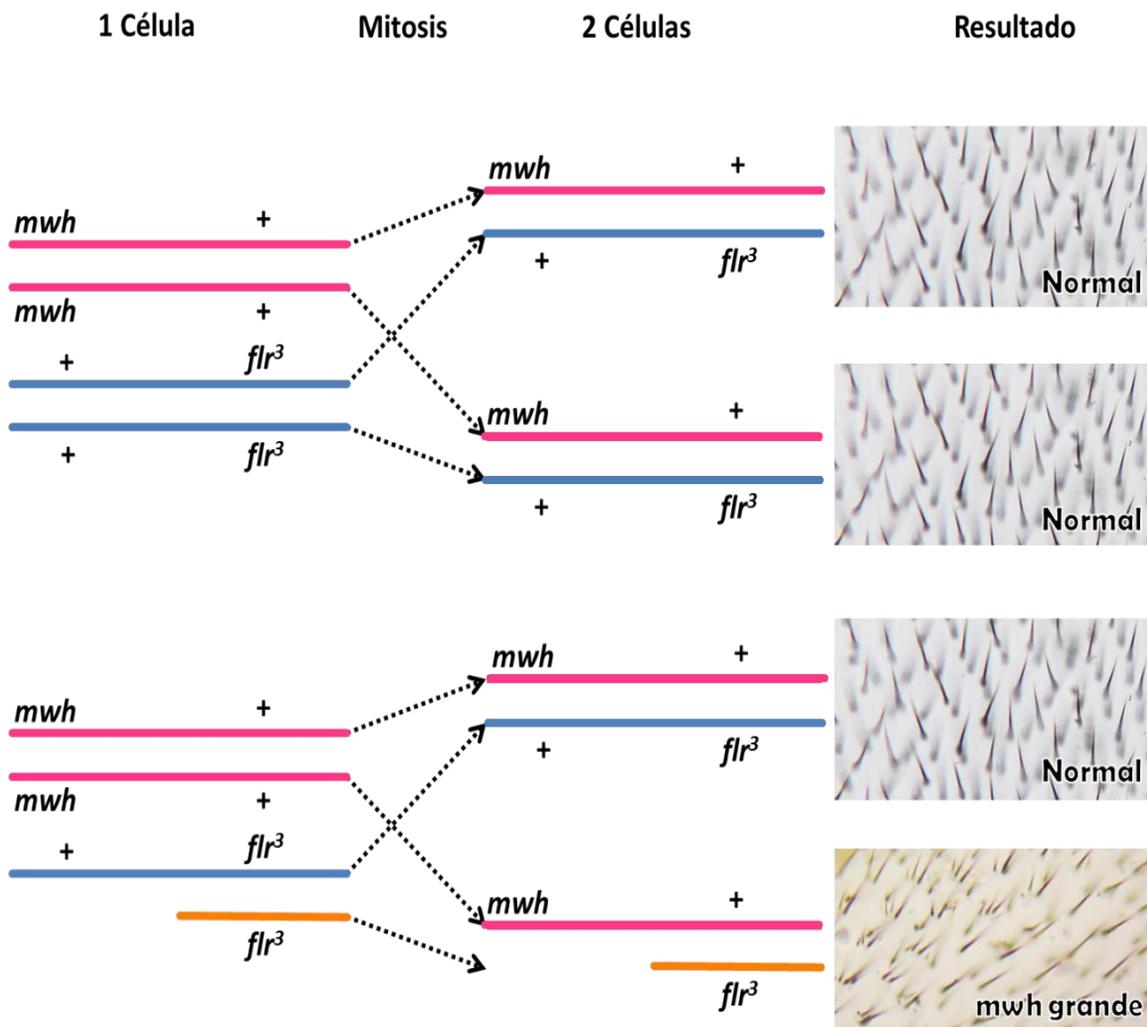


Fig. 11. ARRIBA: Evento normal en el que no se pierde la heterocigosis, los tricomas presentan un fenotipo silvestre. ABAJO: Deleción, se pierde uno de los marcadores dominantes (perdiendo la heterocigosis) dando como resultado una mancha *mwh* que es grande si el evento ocurre en las primeras divisiones de las células del disco imaginal.

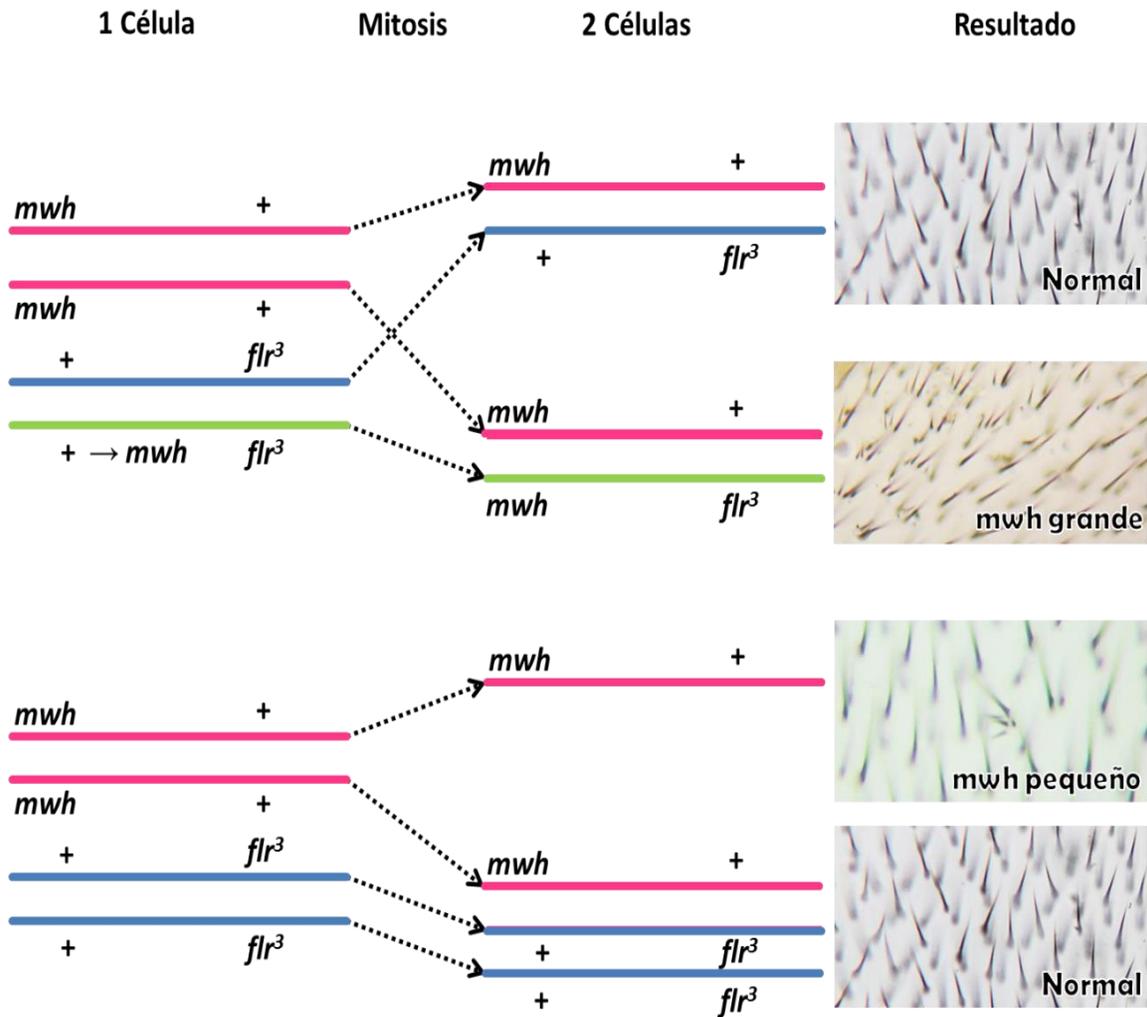


Fig. 12. ARRIBA. Mutación puntual, en este caso, el alelo *mwh* silvestre muta a *mwh*, dando como resultado la pérdida de heterocigosis y una mancha *mwh*. ABAJO. No disyunción, uno de los brazos no se separa adecuadamente durante la mitosis, dando como resultado una mancha *mwh* que generalmente será pequeña.

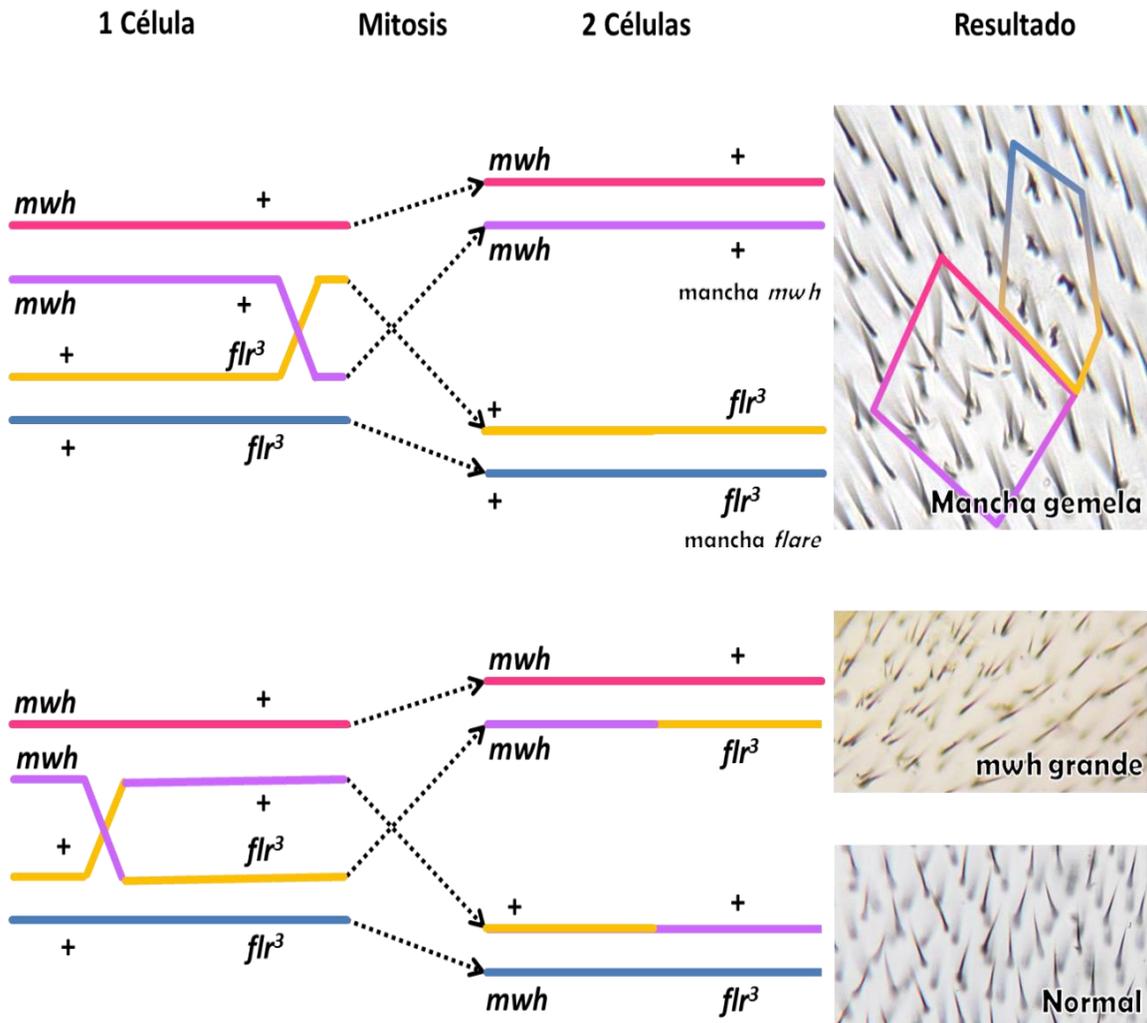


Fig. 13. Recombinación en células somáticas. ARRIBA. En este caso la recombinación se da cerca del centrómero, el resultado es la combinación de ambos marcadores en células adyacentes, lo que se denomina mancha gemela. ABAJO. Aquí, la recombinación se presenta en la zona distal al centrómero, esto da como resultado una célula con un fenotipo silvestre o normal y otra que originará una mancha *mwh*.

Justificación

Debido a que el consumo de la NIC es uno de los factores de riesgo de cáncer más importantes, ya que produce radicales libres y promueve el estrés oxidante, se han propuesto terapias alternativas como es el uso de antioxidantes; uno de ellos es el RES, al cual se le ha atribuido efectos quimio-preventivos y quimio-terapéuticos. Sin embargo, este último también ha mostrado en diferentes trabajos, efectos genotóxicos *per se*, así como en co-tratamiento con otros compuestos, por lo anterior, se buscó evaluar los efectos de este antioxidante en co-tratamiento con la NIC.

Hipótesis

El efecto de la nicotina será modulado de manera dosis-dependiente en co-tratamiento con resveratrol

Objetivos

General:

- Evaluar el posible efecto genotóxico de dos concentraciones de RES en co-tratamiento con diferentes concentraciones de NIC, empleando SMART en ala de *D. melanogaster*.

Particulares:

- Observar el efecto genotóxico de la NIC [0.456, 1.9, 3.8, 11.4 mM] con la técnica de SMART en ala de *D. melanogaster*.
- Confirmar el efecto genotóxico de RES [11mM]
- Comprobar el efecto genotóxico de RES [0.4mM]
- Determinar la probable interacción entre los efectos genotóxicos de la NIC [0.456, 1.9, 3.8, 11.4 mM] y los del RES [0.4 y 11 mM]

Materiales y Métodos

“La ciencia es una forma de pensar,
mucho más que un conjunto de conocimientos”
Carl Sagan

Biológicos



D. melanogaster cepa “multiple wing hairs” o mwh (*mwh/mwh*)



D. melanogaster cepa “flare³” (*flr³/TM3, Bd^S*)

*Donadas en 1996 por el Dr. Ulrich Graf del Swiss Federal Institute of Technology y mantenidas en el Laboratorio de Genética Toxicológica de la FES Iztacala, UNAM.

Medios



Medio Instantáneo Drosophila (en inglés, *Drosophila Instant Medium –DIM–*). Adquirido de *Carolina Biological Supply Co.* Medio para experimentos.



Hojuelas de Puré de Papa Maggie[®]. Medio estándar de propagación y mantenimiento de las cepas.



Levadura fresca “La Florida”[®]. Activada con dextrosa y agua para usarla como medio de colecta de huevos.

Químicos



Resveratrol (RES). $C_{14}H_{12}O_3$. CAS 501-36-0. 99% de pureza. Sigma-Aldrich.



Etanol (EtOH). C_2H_6O . CAS 64-17-5. 99.9% de pureza. Fermont.



Nicotina (NIC). $C_{10}H_{14}N_2$. CAS 54-11-5. 99% de pureza. Sigma-Aldrich.



Dimetil-nitrosamina (DMN). $(CH_3)_2N_2O$. CAS 62-75-9. Sigma-Aldrich.



Entellan. $C_{13}H_{22}O_4$. CAS 1.07961. ©Merck KGaA.



Metanol (metOH) grado HPLC. CH_3OH . CAS 67-56-1. JT Baker.



Solución conservadora. 1L consiste de 990 mL de agua corriente, 5 mL de Tegosept® (Nipagin) al 12% (12 mg aforados a 100 mL de EtOH) y 5 mL de ácido propiónico.

Propagación de las cepas

Se propagaron las cepas mwh y flare³ en frascos de 250 mL estériles usando como medio 5 g de hojuelas de puré de papa Maggie® con 20 mL de “solución conservadora”, la cual sirve como bactericida y fungicida (Dueñas *et al.*, 2002). Las cepas se mantuvieron en una incubadora a $25^\circ \pm 2^\circ C$ con una humedad relativa (HR) de 65%.

Los organismos eran cambiados de frasco cada tercer día hasta obtener una cantidad de 8 a 12 frascos aproximadamente.

Finalmente, cuando todos los frascos tuvieron organismos adultos de diferentes edades, fueron recolocados en 8 ó 12 frascos poniendo moscas de diferentes edades de manera aleatoria, con la finalidad de sincronizar las edades. Para la realización de la cruce estándar, se trabajó con la generación de los organismos ya sincronizados.

Cruza Estándar (CE) (*flr³* /TM3, *Bd^S* X *mwh/mwh*)

Para aislar a las hembras vírgenes de la cepa *flare*³, los organismos que tenían menos de 3 horas de haber emergido fueron dormidos con CO₂. Las hembras fueron colectadas de 5 en 5, dentro de tubos de ensaye con 0.5 g de las hojuelas de papa con 2 mL de solución conservadora. Se esperó un lapso de 5 días posteriores al aislamiento para asegurar que no hubiese ninguna ovoposición (las hembras que se encontraban en un tubo en el que se hubiese desarrollado alguna larva fueron excluidas).

Una vez obtenido el número necesario de hembras para realizar la cruce (en este trabajo fue de ~800 hembras vírgenes), se agregó un macho *mwh* por cada dos hembras y se mantuvieron en frascos de 250 mL estériles con el medio del puré de papa.

Finalmente, una semana después a la realización de la cruce, se colocaron los organismos en otros frascos de un 250 mL con medio de levadura

fresca activada (ANEXO 4) para colectar los huevos de esta cruce durante ocho horas. Los huevos se incubaron durante 72 ± 4 horas a una temperatura de 25°C , 65% de humedad relativa y oscuridad absoluta.

Diseño experimental

Se realizaron tres experimentos independientes en los que se administraron co-tratamientos crónicos (48 h) de diferentes concentraciones de NIC [0.456, 1.9, 3.8, 11.4 mM] con dos concentraciones de RES [0.28 y 11 μM], además de los testigos positivos (NIC) y negativos (EtOH 1%, RES y Agua milli-Q). En cada tubo de ensayo se colocaron 0.5 g de medio Carolina y 2 mL de la solución de cada tratamiento.

Se colectaron las larvas de 72 h de los frascos con el medio de levadura. Se lavaron con agua corriente y una coladera con rejilla fina. Se tomó una porción estándar de éstas, procurando colocar la misma cantidad en cada tubo de ensayo.

Cada grupo de ensayo se repartió en diferentes incubadoras para evitar algún tipo de contaminación. Se mantuvieron durante 5 – 8 días en condiciones de oscuridad absoluta a una temperatura de 25°C y 65% de humedad relativa, monitoreando su emergencia a partir del quinto día.

Se les administraron co-tratamientos crónicos (48 h) de diferentes concentraciones de NIC [0.456, 1.9, 3.8, 11.4 mM] con dos concentraciones de RES

[0.28 y 11 μ M], además de los testigos positivos (NIC) y negativos (EtOH 1%, ambas concentraciones de RES y Agua milli-Q). Se realizaron tres experimentos independientes con tres réplicas/tratamiento.

Tabla 10. Diseño Experimental

Testigos	Testigos Nicotina	Co-Tratamientos
EtOH 1%	NIC [0.456 mM]	NIC [0.456 mM] + RES [0.28 μ M]
		NIC [0.456 mM] + RES [11 μ M]
RES [0.28 μ M]	NIC [1.9 mM]	NIC [1.9 mM] + RES [0.28 μ M]
		NIC [1.9 mM] + RES [11 μ M]
RES [11 μ M]	NIC [3.8 mM]	NIC [3.8 mM] + RES [0.28 μ M]
		NIC [3.8 mM] + RES [11 μ M]
Agua milli Q	NIC [11.4 mM]	NIC [11.4 mM] + RES [0.28 μ M]
		NIC [11.4 mM] + RES [11 μ M]

Una vez obtenidos los imagos, éstos se fijaron en EtOH 70%. Las alas se montaron en preparaciones permanentes, usando Entellan[®], colocando pequeñas barras metálicas de 40 gramos encima para eliminar toda burbuja de aire que pudiera quedar en la preparación.

Cada preparación se analizó empleando el microscopio óptico a 40x con estricto control de lectura.

Finalmente se realizó el análisis estadístico con la prueba Kastenbaum-Bowan para proporciones SMART PC-Versión 2 y en caso de resultados débiles positivos, se empleó la prueba U de Mann-Whitney y Wilcoxon STAT graphics 6.0. (ANEXO 5)

Resultados

“En algún lugar, algo increíble
está esperando ser descubierto”
Carl Sagan

En el presente estudio se utilizaron concentraciones de NIC mayores a la CL_{50} reportada para la cepa Canton S^+ de *Drosophila melanogaster* (Velázquez-Ulloa Com. Per.); pese a esto, se observaron diferencias ya que el número aproximado de organismos emergidos variaron dependiendo del tratamiento y co-tratamiento. Considerando que cada vial tenía aproximadamente el mismo número de larvas, se observó que la mortalidad de las larvas en los tratamientos con NIC fue aproximadamente mayor conforme aumentó a la concentración. Sin embargo, en co-tratamiento con resveratrol, se apreció el incremento en el número de moscas recuperadas y éste fue mayor conforme aumentó la concentración del polifenol (Figura 15).

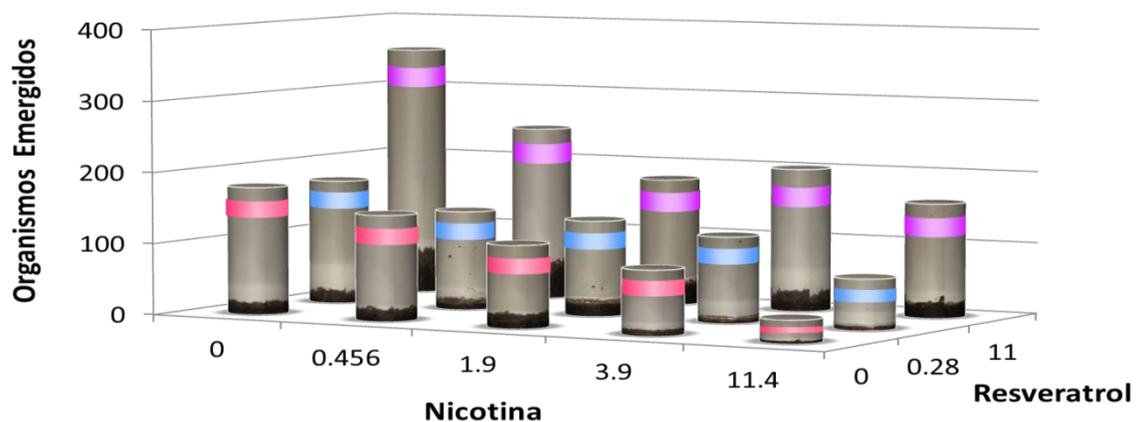


Fig. 14. Estimado de la sobrevivencia de organismos emergidos después de la aplicación de los tratamientos y sus disolventes, Agua milli-Q para NIC y EtOH1% para los co-tratamientos. ROSA: Grupo testigo NIC; AZUL: Co-tratamiento de NIC + RES 0.28 μ M; MORADO: Co-tratamientos de NIC + RES 11 μ M.

Para el bioensayo de genotoxicidad, se revisaron 644 individuos (1,288 alas) y se obtuvieron las frecuencias de clones mutantes (manchas)/individuo (Tabla 11). Se observó que los tratamientos de EtOH [1%]; NIC [0.456, 1.9 y 3.8 mM] y RES [0.28 μ M] no mostraron ser genotóxicos al ser comparados con su testigo solvente (Figuras 16 y 17). Sin embargo, NIC [11.4 mM] mostró genotoxicidad en manchas pequeñas y totales (Figura 16). Por su parte, el testigo RES [11 μ M] mostró ser genotóxico por el incremento de manchas gemelas (Figura 18).

Los co-tratamientos NIC + RES [0.28 μ M] no mostraron modificaciones, ni protección del daño genotóxico provocado por NIC a la concentración [11.4 mM], además de que aumentó el daño en la concentración [1.9 mM] volviendo a este último co-tratamiento en genotóxico en relación a manchas pequeñas, grandes y totales (Figura 17).

El RES [11 μ M] disminuyó la genotoxicidad provocada por NIC [11.4 mM], y además la aumentó en las demás concentraciones de NIC para los diferentes tipos de manchas, así como en las totales (Figura 18).

Tabla 11. Resumen de los resultados obtenidos en el ensayo en ala de *D. melanogaster* (SMART) después de analizar las alas con fenotipo silvestre de moscas que emergieron de las larvas (72±4 h de edad) alimentadas con tratamientos crónicos (48 h) de RES [0.0, 0.418 y 11.0 µM], con y sin NIC (NIC) [0.456, 1.9, 3.8 y 11.4 mM]; EtOH, 1% y Agua como testigos disolventes.

Tratamiento [concentración]	No. Ind.	Manchas por individuo (número de manchas) diagnóstico estadístico ¹									
		Manchas pequeñas (1-2 células) m=2		Manchas grandes (> 2 células) m=5		Manchas gemelas m=5		Manchas totales m=2		Ciones mw h	
A. Testigos Disolventes											
H ₂ O	43	0.56	(24)	0.12	(5)	0.00	(0)	0.67	(29)		29
EtOH [1%]	57	0.39	(22)	0.09	(5)	0.00	(0)	0.47	(27)		27
B. Testigos NIC [mM] vs. testigo Agua											
H ₂ O	43	0.56	(24)	0.12	(5)	0.00	(0)	0.67	(29)		29
NIC [0.456]	38	0.68	(26)	0.05	(2)	0.00	(0)	0.74	(28)		28
NIC [1.9]	46	0.57	(26)	0.04	(2)	0.02	(1)	0.63	(29)		28
NIC [3.8]	32	0.62	(20)	0.03	(1)	0.03	(1)	0.69	(22)		22
NIC [11.4]	22	1.27	(28)	0.23	(5)	0.05	(1)	1.55	(34)		34
C. Testigos RES [µM] vs. testigo EtOH [1%]											
EtOH [1%]	57	0.39	(22)	0.09	(5)	0.00	(0)	0.47	(27)		27
RES [0.28]	57	0.54	(31)	0.07	(4)	0.00	(0)	0.61	(35)		33
RES [11]	58	0.47	(27)	0.03	(2)	0.07	(4)	0.57	(33)		32
D. Co-tratamientos NIC [mM]/RES [µM] vs. testigo EtOH [1%]											
EtOH [1%]	57	0.39	(22)	0.09	(5)	0.00	(0)	0.47	(27)		27
NIC [0.456] + RES [0.28]	33	0.61	(20)	0.06	(2)	0.00	(0)	0.67	(22)		22
NIC [1.9] + RES [0.28]	22	0.77	(17)	0.27	(6)	0.00	(0)	1.05	(23)		23
NIC [3.8] + RES [0.28]	37	0.43	(16)	0.05	(2)	0.00	(0)	0.49	(18)		16
NIC [11.4] + RES [0.28]	13	0.92	(12)	0.38	(5)	0.00	(0)	1.31	(17)		17
NIC [0.456] + RES [11]	45	0.69	(31)	0.04	(2)	0.07	(4)	0.80	(36)		36
NIC [1.9] + RES [11]	42	0.76	(32)	0.10	(4)	0.12	(5)	0.98	(41)		41
NIC [3.8] + RES [11]	52	0.62	(32)	0.12	(6)	0.04	(2)	0.77	(40)		20
NIC [11.4] + RES [11]	37	0.38	(14)	0.14	(5)	0.05	(2)	0.57	(21)		20
E. Co-tratamientos NIC [mM]/RES [µM] vs. testigo Resveratrol [0.418 µM]											
RES [0.28]	57	0.54	(31)	0.07	(4)	0.00	(0)	0.61	(35)		33
NIC [0.456] + RES [0.28]	33	0.61	(20)	0.06	(2)	0.00	(0)	0.67	(22)		22
NIC [1.9] + RES [0.28]	22	0.77	(17)	0.27	(6)	0.00	(0)	1.05	(23)		23
NIC [3.8] + RES [0.28]	37	0.43	(16)	0.05	(2)	0.00	(0)	0.49	(18)		16
NIC [11.4] + RES [0.28]	13	0.92	(12)	0.38	(5)	0.00	(0)	1.31	(17)		17
F. Co-tratamientos NIC [mM]/RES [µM] vs. testigo Resveratrol [11 µM]											
RES [11]	58	0.47	(27)	0.03	(2)	0.07	(4)	0.57	(33)		32
NIC [0.456] + RES [11]	45	0.69	(31)	0.04	(2)	0.07	(3)	0.80	(36)		36
NIC [1.9] + RES [11]	42	0.76	(32)	0.10	(4)	0.12	(5)	0.98	(41)		41
NIC [3.8] + RES [11]	52	0.62	(32)	0.12	(6)	0.04	(2)	0.77	(40)		40
NIC [11.4] + RES [11]	37	0.38	(14)	0.14	(5)	0.05	(2)	0.57	(21)		20

G. Co-tratamientos NIC [0.456 mM]/RES [μM] vs. testigo NIC [0.456 mM]										
NIC [0.456]	38	0.68	(26)	0.05	(2)	0.00	(0)	0.74	(28)	28
NIC [0.456] + RES [0.28]	33	0.61	(20)	-	0.06	(2)	-	0.00	(0)	-
NIC [0.456] + RES [11]	45	0.69	(31)	-	0.04	(2)	-	0.07	(3)	-
H. Co-tratamientos NIC [1.9 mM]/RES [μM] vs. testigo NIC [1.9 mM]										
NIC [1.9]	46	0.57	(26)	0.04	(2)	0.02	(1)	0.63	(29)	28
NIC [1.9] + RES [0.28]	22	0.77	(17)	-	0.27	(6)	+	0.00	(0)	-
NIC [1.9] + RES [11]	42	0.76	(32)	-	0.10	(4)	-	0.12	(5)	+
I. Co-tratamientos NIC [3.8 mM]/RES [μM] vs. testigo NIC [3.8 mM]										
NIC [3.8]	32	0.62	(20)	0.03	(1)	0.03	(1)	0.69	(22)	22
NIC [3.8] + RES [0.28]	37	0.43	(16)	-	0.05	(2)	-	0.00	(0)	-
NIC [3.8] + RES [11]	52	0.62	(32)	- ^o	0.12	(6)	-	0.04	(2)	-
J. Co-tratamientos NIC [11.4 mM]/RES [μM] vs. testigo NIC [11.4 mM]										
NIC [11.4]	22	1.27	(28)	0.23	(5)	0.05	(1)	1.55	(34)	34
NIC [11.4] + RES [0.28]	13	0.92	(12)	-	0.38	(5)	-	0.00	(0)	-
NIC [11.4] + RES [11]	37	0.38	(14)	↓ ^o	0.14	(5)	-	0.05	(2)	-

¹ Diagnóstico estadístico de acuerdo a Frei y Würigler (1988 y 1995) comparados con el testigo correspondiente, donde: positivo= +; negativo= -; disminución de daño=↓ ($p < 0.05$). En amarillo los datos significativos. *No son significativos dado que en la prueba de U de Mann Whitney y Wilcoxon no mostraron diferencia significativa. Los tratamientos que aparecieron como “indecisos” para el programa SMART PC-Version 2, al ser sometidos a la prueba de U de Mann-Whitney y Wilcoxon STAT Graphics 6.0, se confirmaron como positivos o negativos.

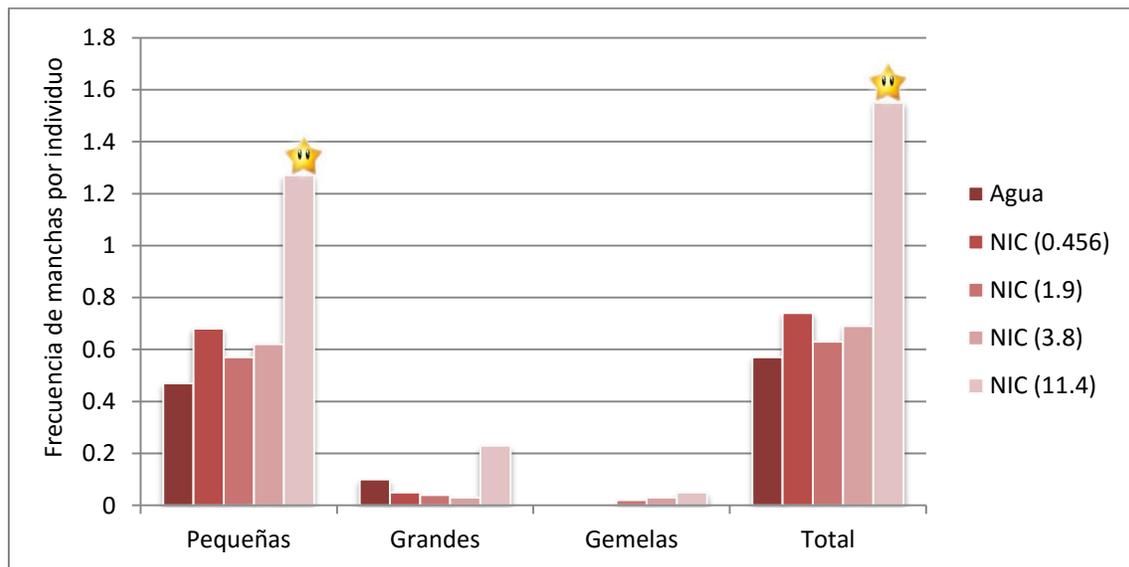


Fig. 15. Frecuencia de clones pequeños, grandes gemelos y totales por individuo de los testigos NIC. Las frecuencias de las barras marcadas con estrellas son significativas de acuerdo con Frei y Würigler (1988, 1995).

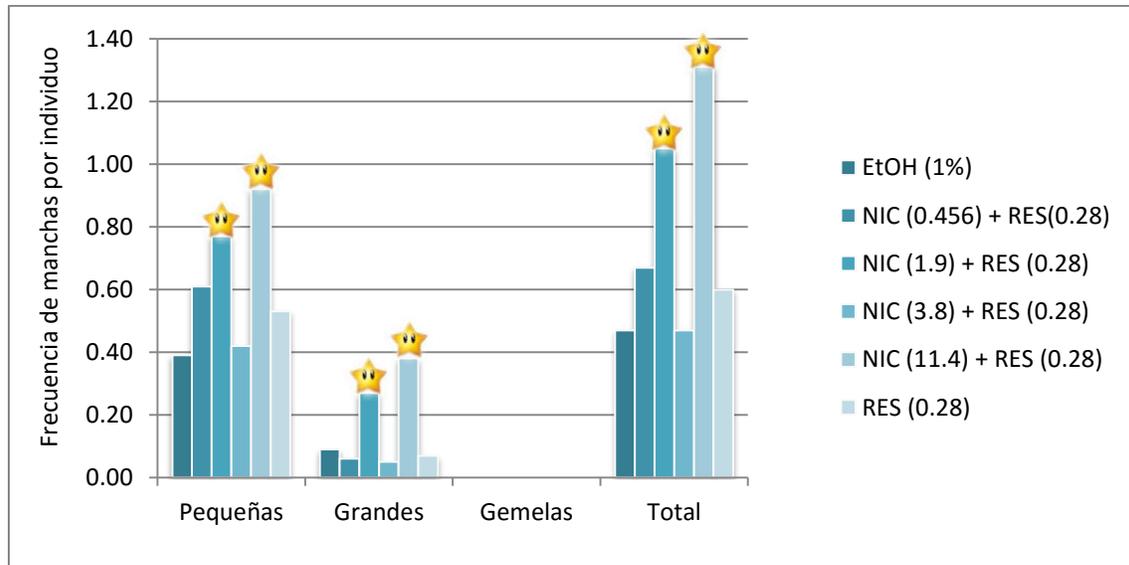


Fig. 16. Frecuencia de manchas pequeñas, grandes, gemelas y totales de los co-tratamientos NIC [0.456, 1.9, 3.8 y 11.4mM] + RES [0.28 μ M] contra el testigo EtOH 1%. Las frecuencias de las barras marcadas con estrellas son significativas de acuerdo con Frei y Würgler (1988, 1995).

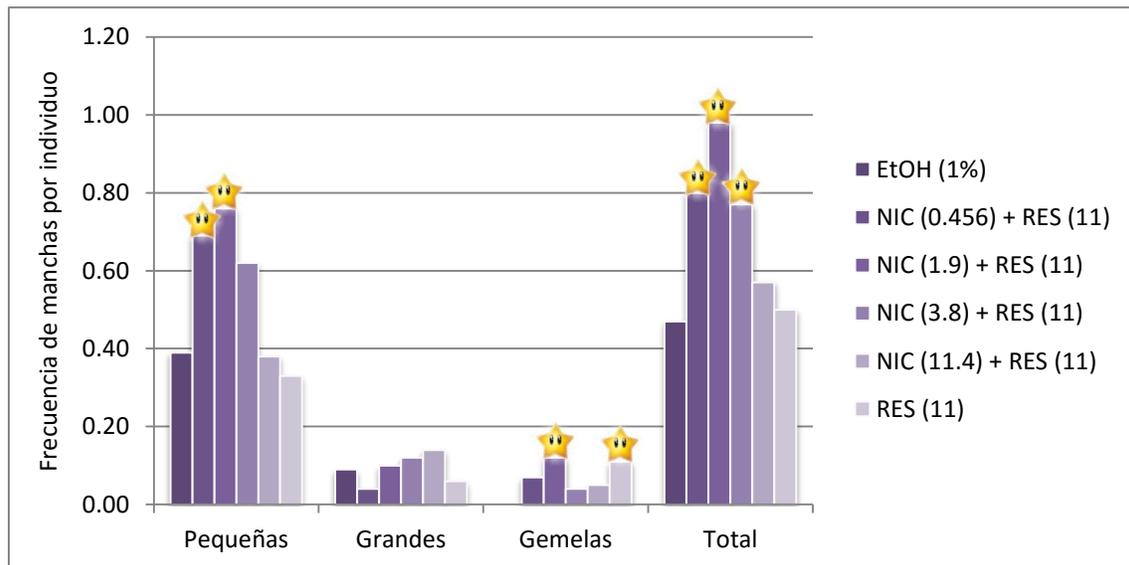


Fig. 17. Frecuencia de manchas pequeñas, grandes, gemelas y totales de los co-tratamientos NIC [0.456, 1.9, 3.8 y 11.4 mM] + RES [11 μ M] contra el testigo EtOH 1%. Las frecuencias de las barras marcadas con estrellas son significativas de acuerdo con Frei y Würgler (1988, 1995).

Con respecto a la distribución del tamaño de clones *mwh*, los resultados obtenidos para los tratamientos con disolventes no mostraron tener diferencias significativas en sus frecuencias acumuladas (Figura 19).

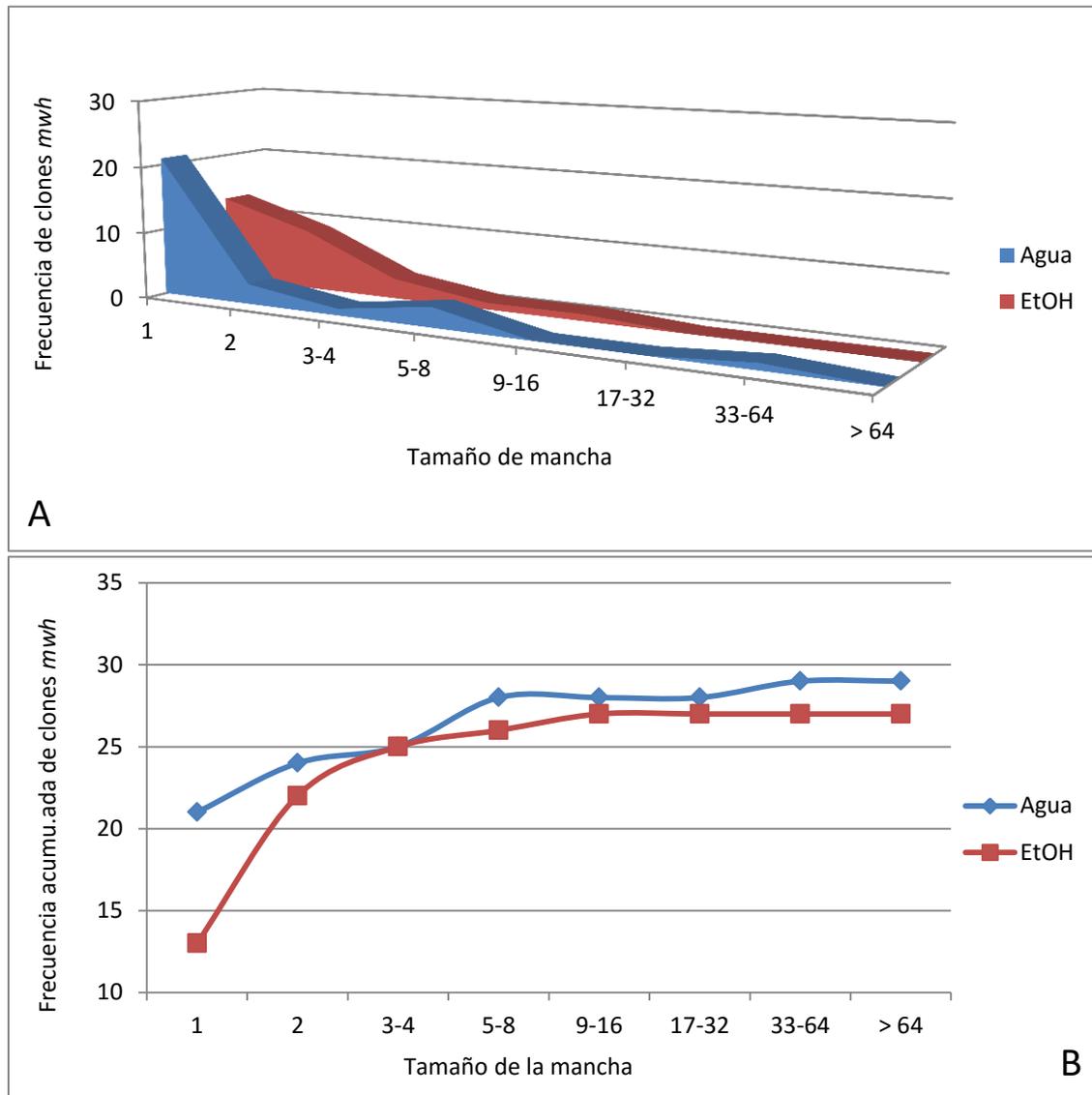


Fig. 18. A. Distribución del tamaño de los clones *mwh* obtenidos con los tratamientos con los disolventes, de acuerdo al número de células mutadas en una mancha. **B.** Comparación de las frecuencias acumuladas de los clones *mwh* entre los disolventes utilizada para el análisis estadístico en la que se observa que no existen diferencias significativas en la distribución de clones.

Los testigos NIC [0.456 y 1.9 mM] no mostraron alteración en la distribución de clones *mwh*, mientras que NIC [11.4 mM] sí mostró diferencia significativa a $p < 0.05$. A pesar de que NIC [3.8 mM] no mostró genotoxicidad, sí alteró la distribución del tamaño de los clones *mwh*, de donde se infiere una alteración en la división celular (Figura 20).

Para el parámetro distribución del tamaño de los clones *mwh*, todos los tratamientos y co-tratamientos presentaron diferencias significativas (incluyendo los testigos RES), con respecto a sus testigos, aun cuando algunos de éstos no presentaron genotoxicidad, como es el caso de NIC [0.456 y 3.8 mM] + RES [0.28 μ M], NIC [11.4 mM] + RES [11 μ M] y RES [0.28 μ M]. (Figuras 21 – 28).

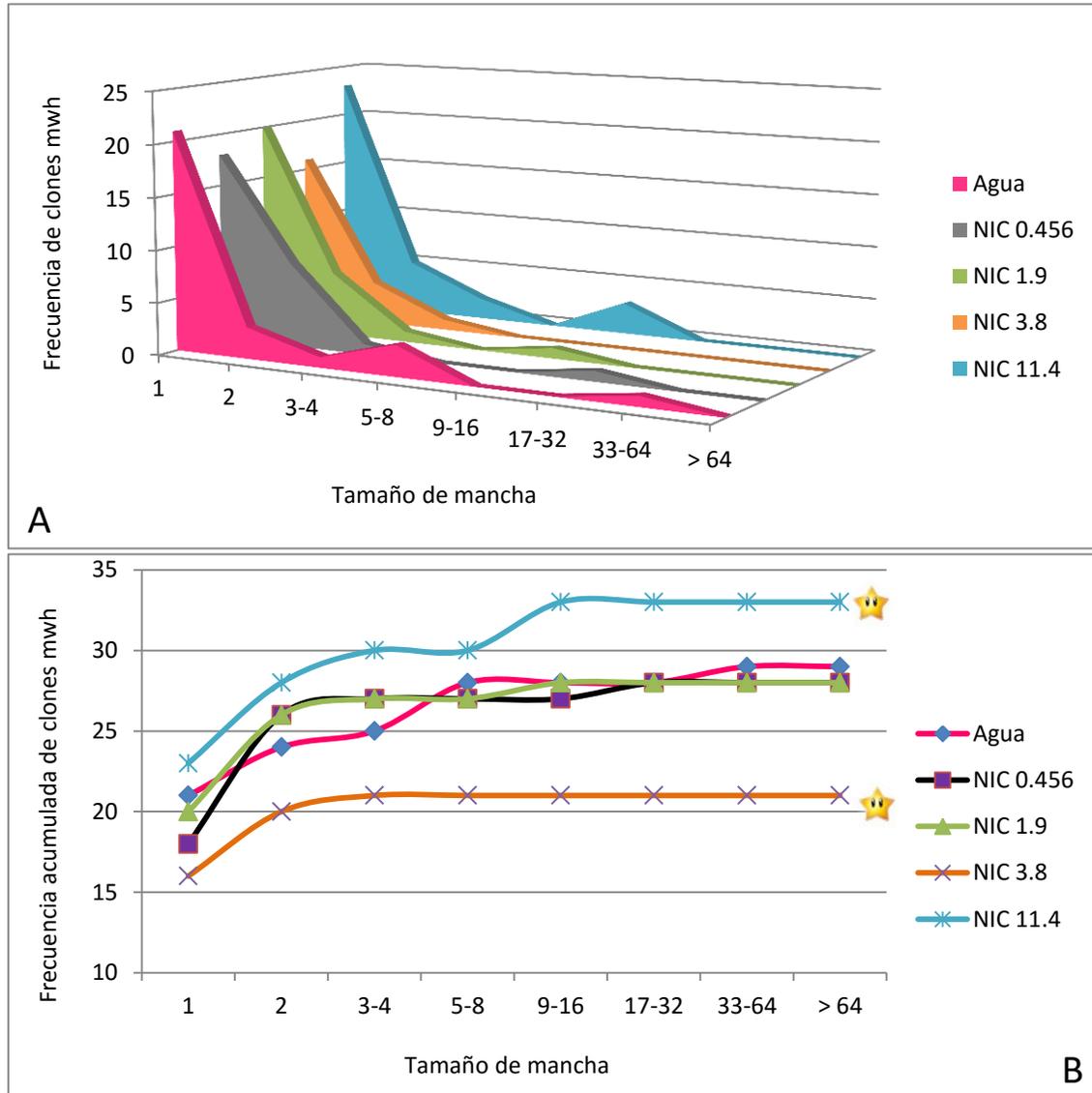


Fig. 19. A. Distribución del tamaño de los clones *mwh* de los testigos NIC contra su disolvente, de acuerdo al número de células mutadas en una mancha. **B.** Comparación de las frecuencias acumuladas de los clones *mwh* entre éstos, utilizada para el análisis estadístico. Las estrellas representan los tratamientos que presentaron diferencias significativas en la distribución del tamaño de los clones.

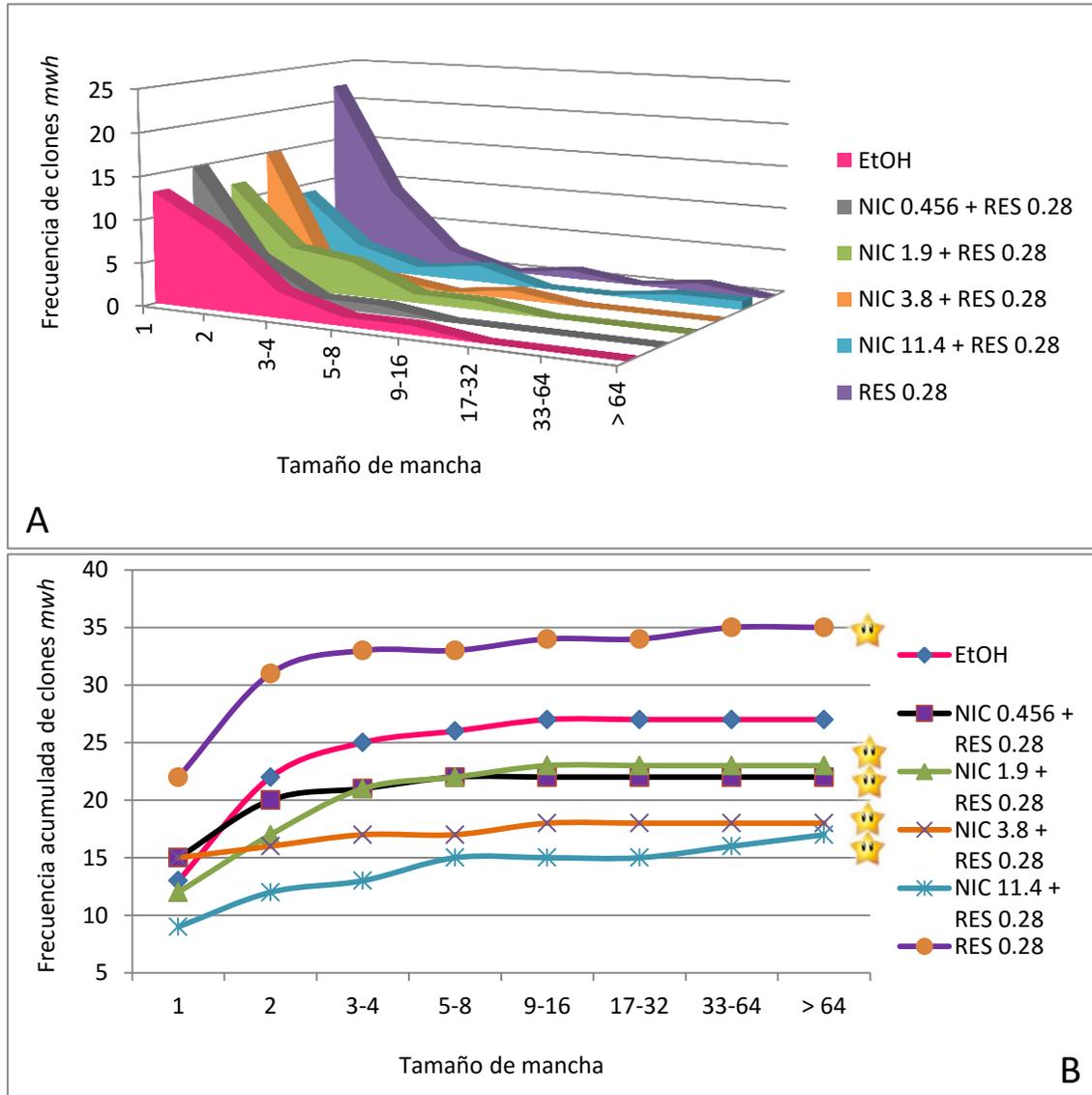


Fig. 20. A. Distribución de clones *mwh* de los co-tratamientos RES 0.28 μM + NIC contra su disolvente, de acuerdo al número de células mutadas en una mancha. **B.** Comparación de la frecuencia acumulada de clones de éstos, utilizada para el análisis estadístico. Las estrellas representan los tratamientos que presentaron diferencias significativas en la distribución de clones.

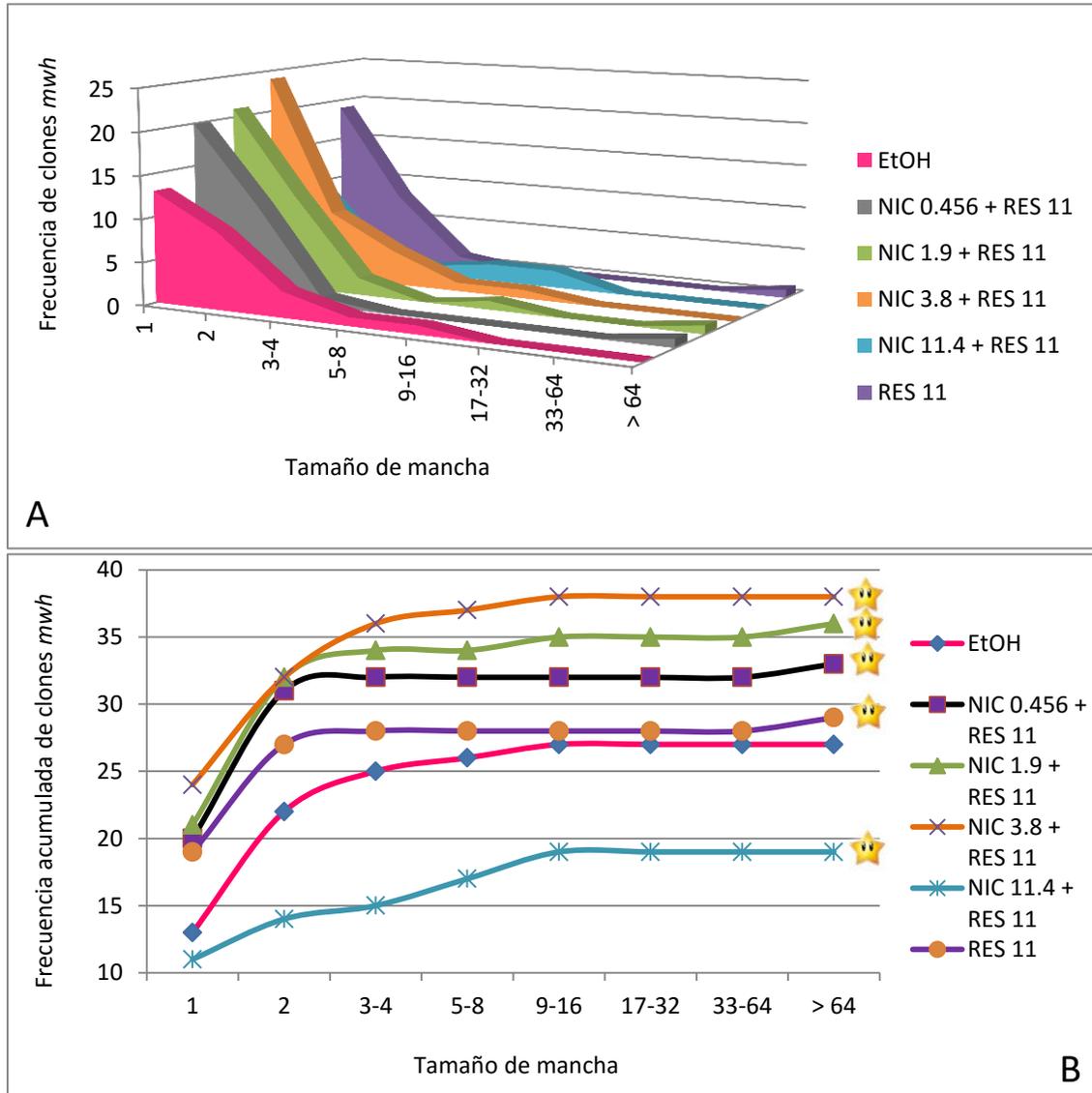


Fig. 21. A. Distribución de clones *mwh* de los co-tratamientos RES 11 uM+ NIC contra su disolvente, de acuerdo al número de células mutadas en una mancha. **B.** Comparación de la frecuencia acumulada de clones de éstos, utilizada para el análisis estadístico. Las estrellas representan los tratamientos que presentaron diferencias significativas en la distribución de clones.

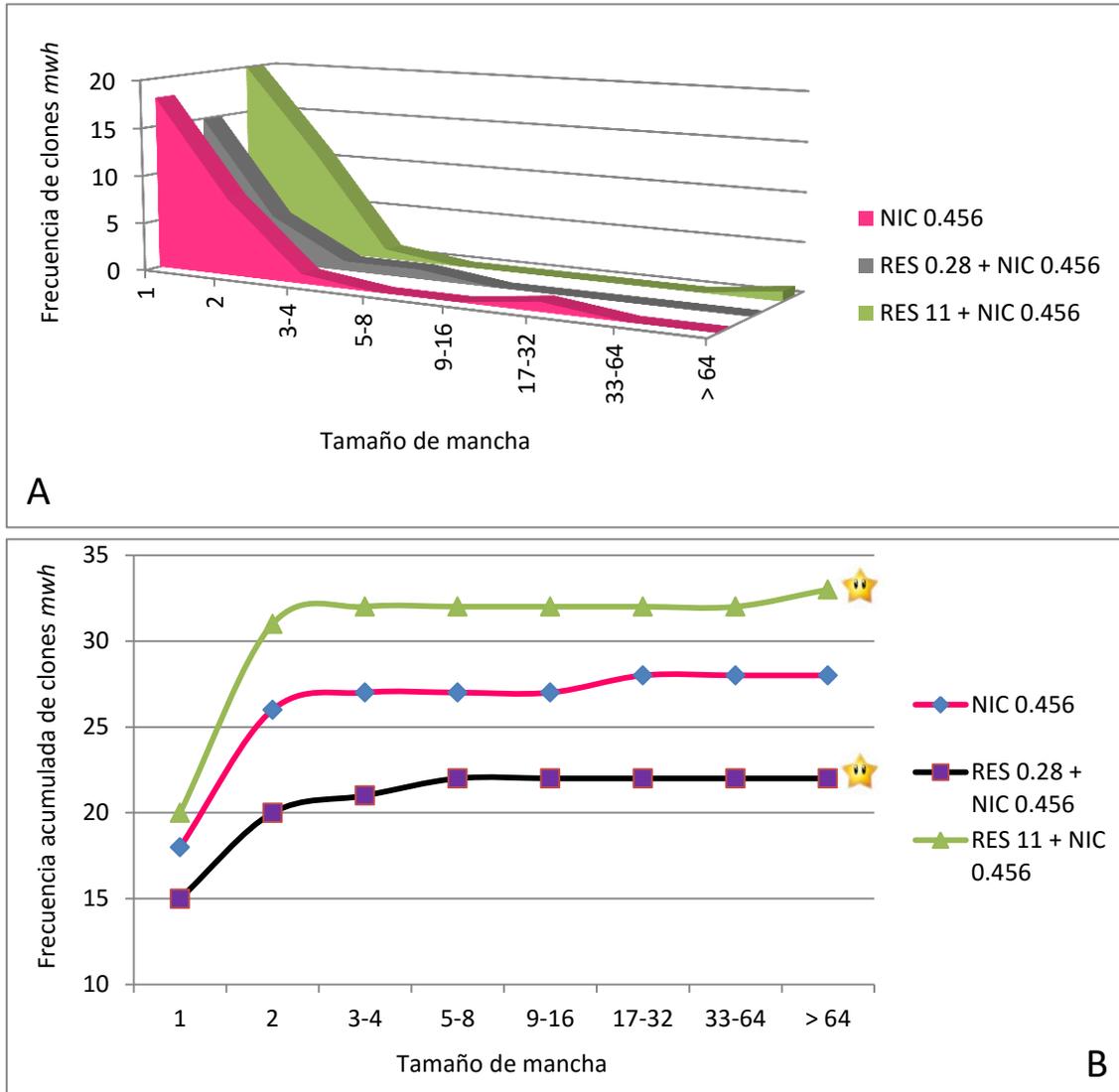


Fig. 22. A. Distribución de clones *mwh* de los co-tratamientos RES [0.28 y 11 μM] + NIC 0.456 μM contra su respectivo testigo de NIC, de acuerdo al número de células mutadas en una mancha. **B.** Comparación de la frecuencia acumulada de clones de éstos, utilizada para el análisis estadístico. Las estrellas representan los tratamientos que presentaron diferencias significativas en la distribución de clones.

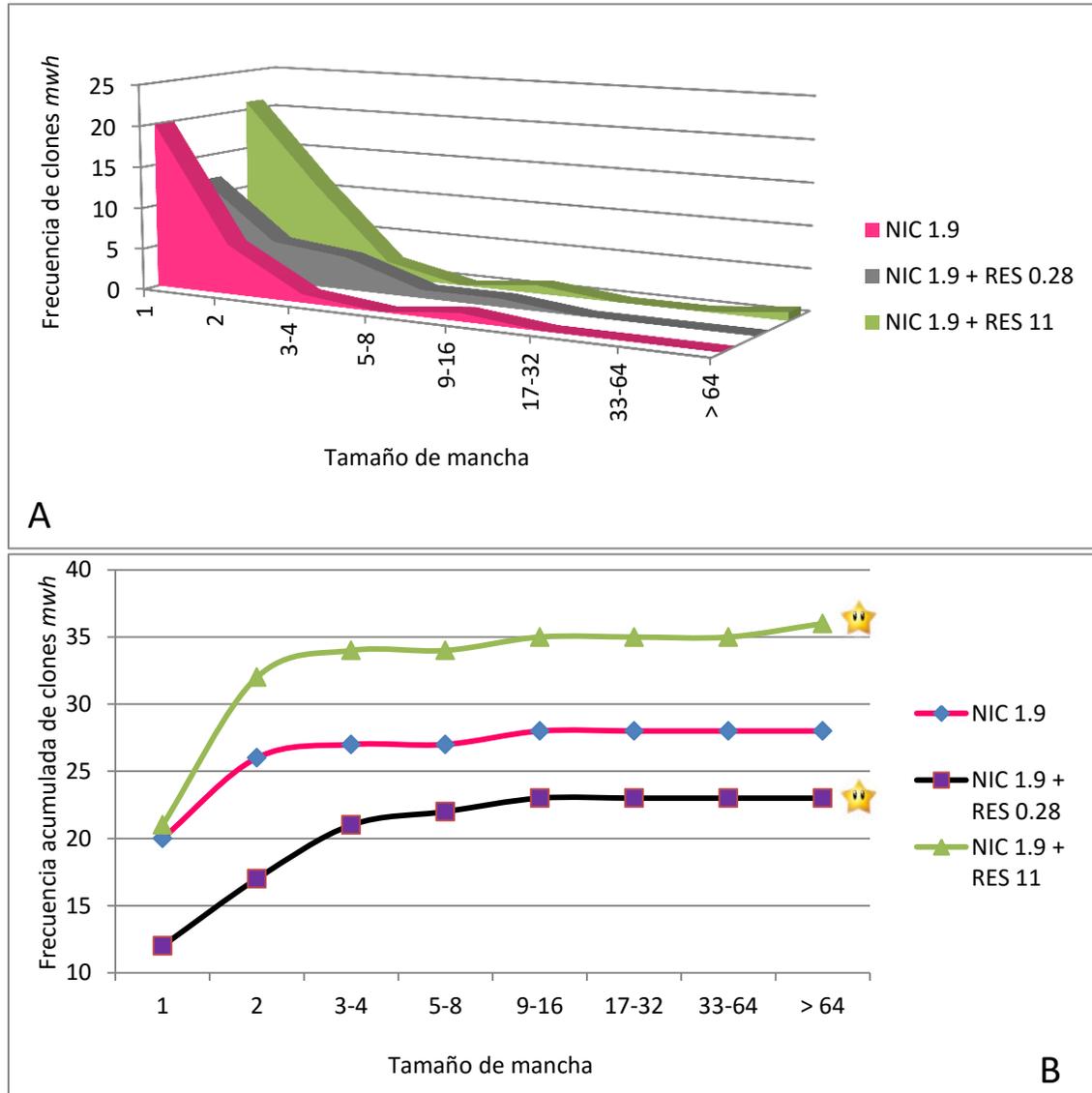


Fig. 23. A. Distribución de clones *mwh* de los co-tratamientos RES [0.28, 11 μ M] + NIC 1.9 μ M contra su respectivo testigo de NIC, de acuerdo al número de células mutadas en una mancha. **B.** Comparación de la frecuencia acumulada de clones de éstos, utilizada para el análisis estadístico. Las estrellas representan los tratamientos que presentaron diferencias significativas en la distribución de clones.

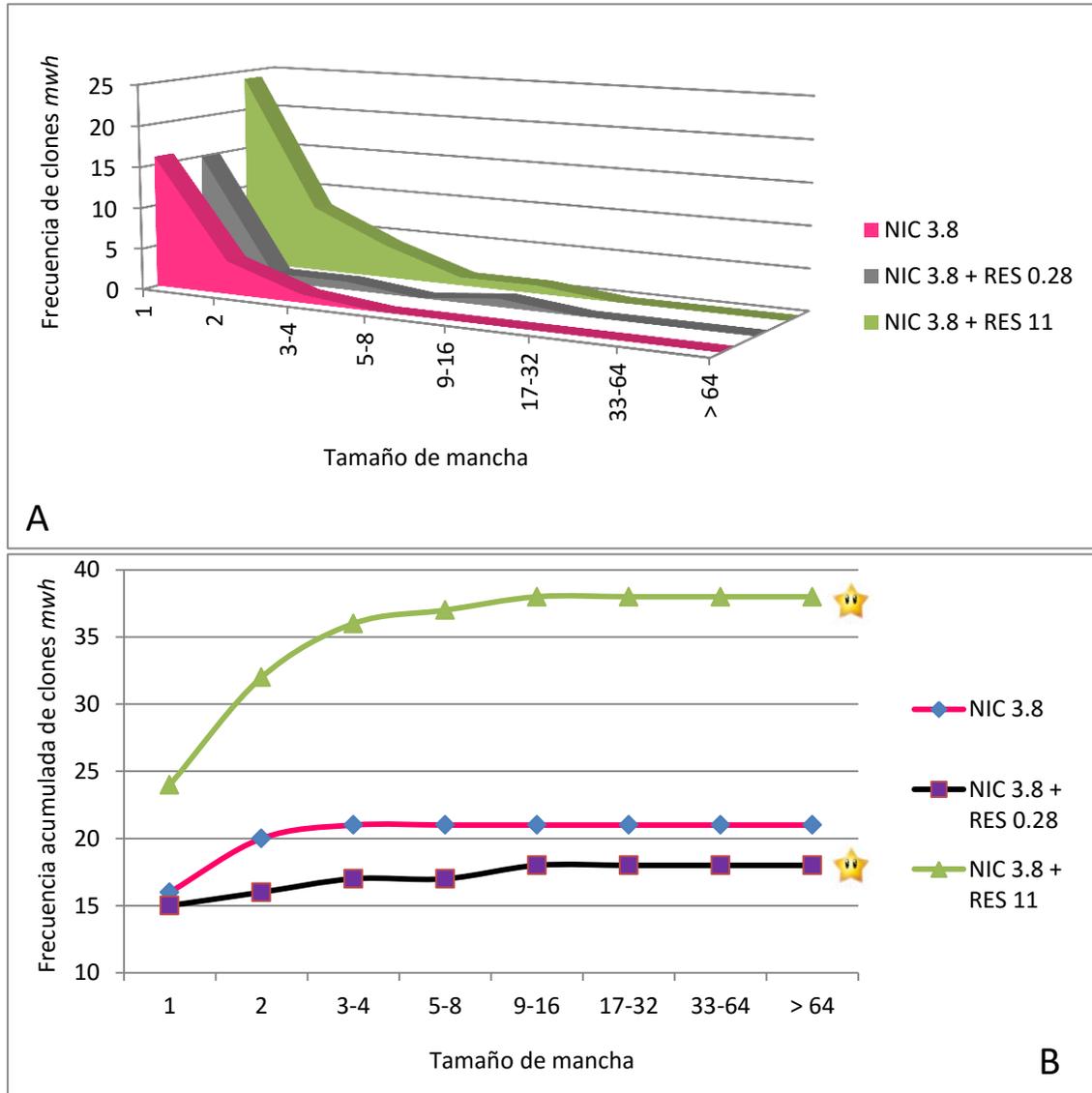


Fig. 24. A. Distribución de clones mwh de los co-tratamientos RES [0.28, 11 μ M] + NIC [3.8 μ M] contra el respectivo testigo de NIC, de acuerdo al número de células mutadas en una mancha. **B.** Comparación de la frecuencia acumulada de clones de éstos, utilizada para el análisis estadístico. Las estrellas representan los tratamientos que presentaron diferencias significativas en la distribución de clones.

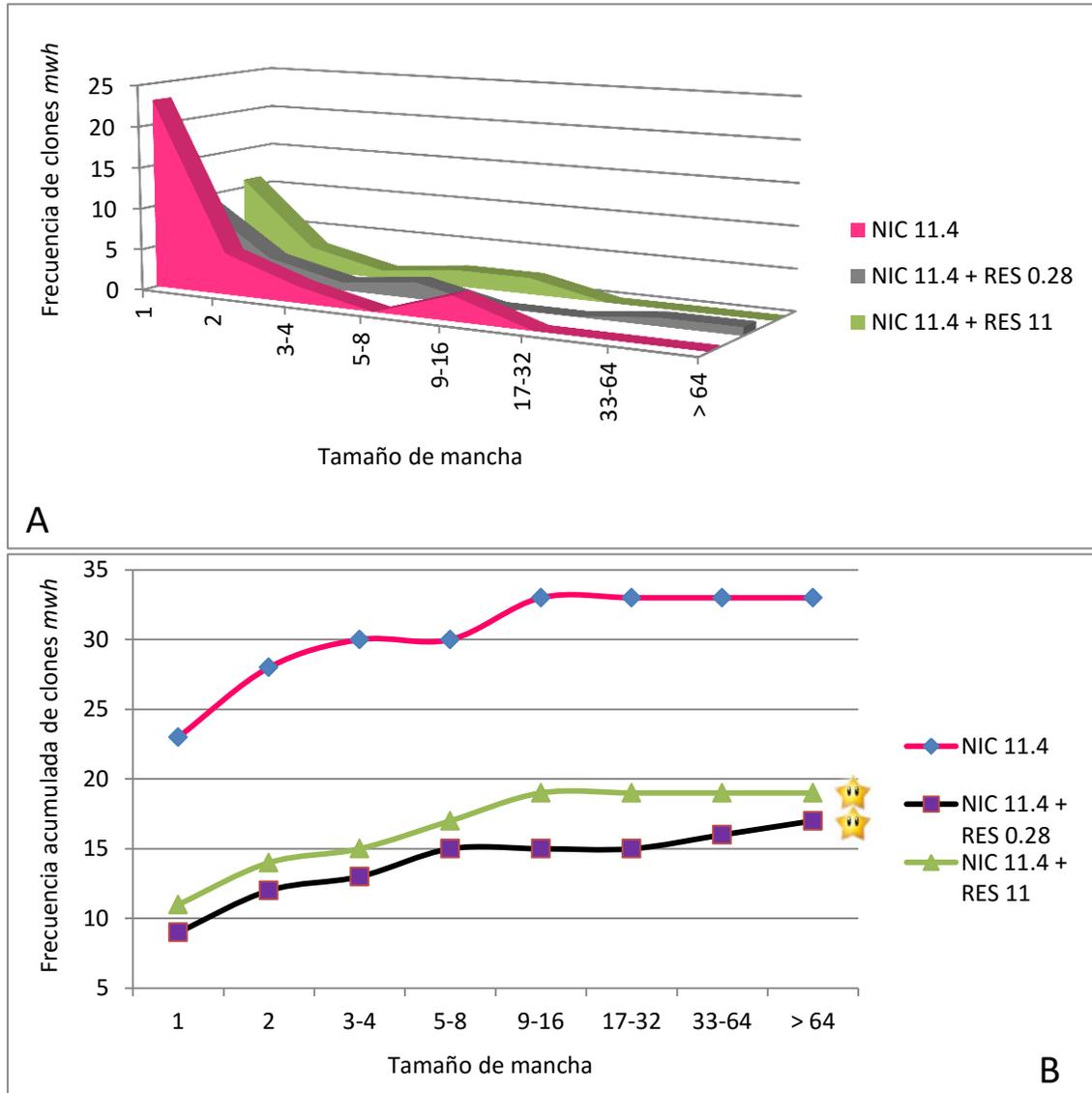


Fig. 25. A. Distribución de clones *mwh* de los co-tratamientos RES [0.28, 11 μ M] + NIC [11.4 μ M] contra su respectivo testigo de NIC, de acuerdo al número de células mutadas en una mancha. **B.** Comparación de la frecuencia acumulada de clones de éstos, utilizada para el análisis estadístico. Las estrellas representan los tratamientos que presentaron diferencias significativas en la distribución de clones.

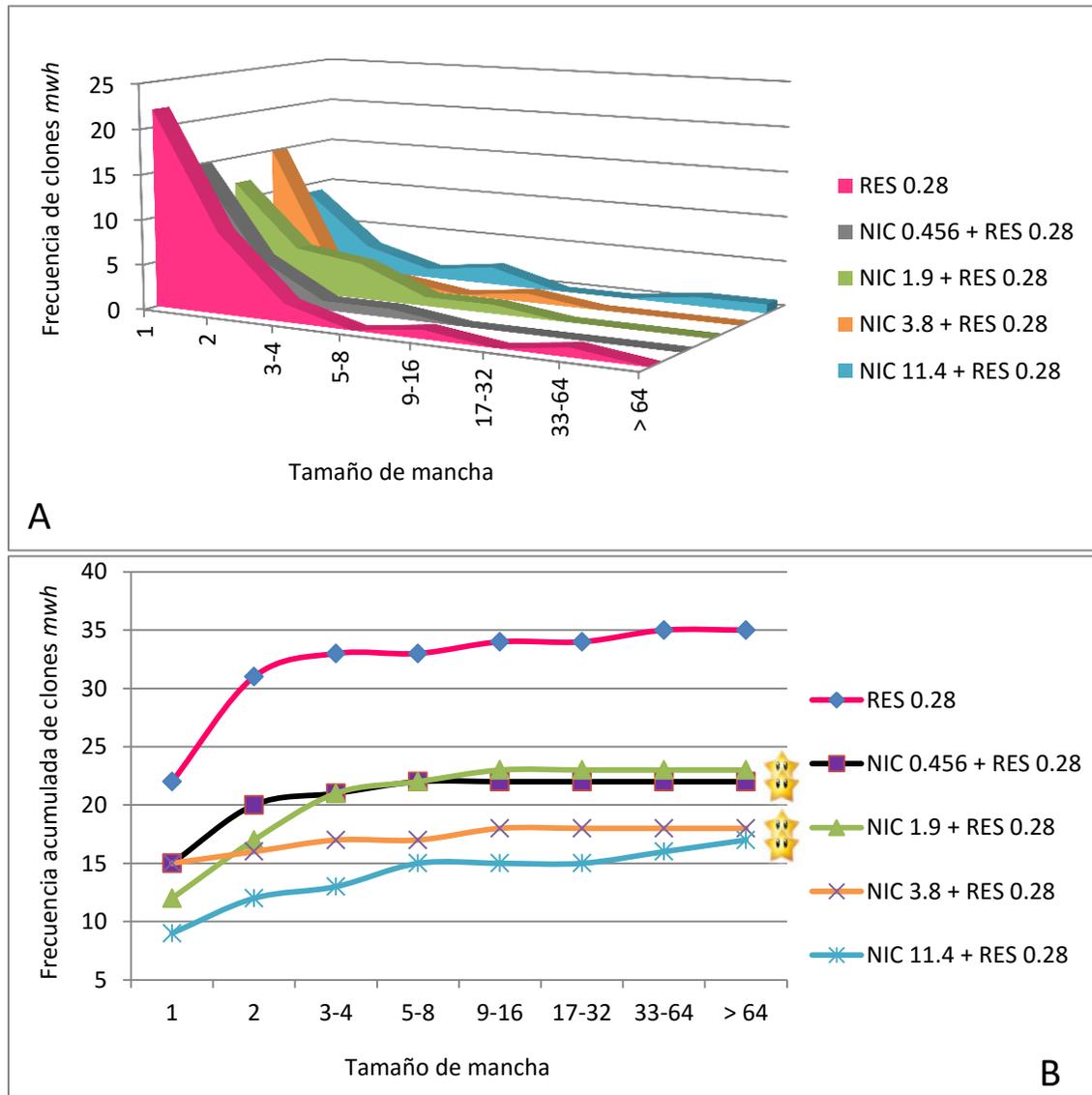


Fig. 26. A. Distribución de clones *mwh* de los co-tratamientos RES 0.28 μ M + NIC contra el respectivo testigo de RES, de acuerdo al número de células mutadas en una mancha. **B.** Comparación de la frecuencia acumulada de clones de éstos, utilizada para el análisis estadístico. Las estrellas representan los tratamientos que presentaron diferencias significativas en la distribución de clones.

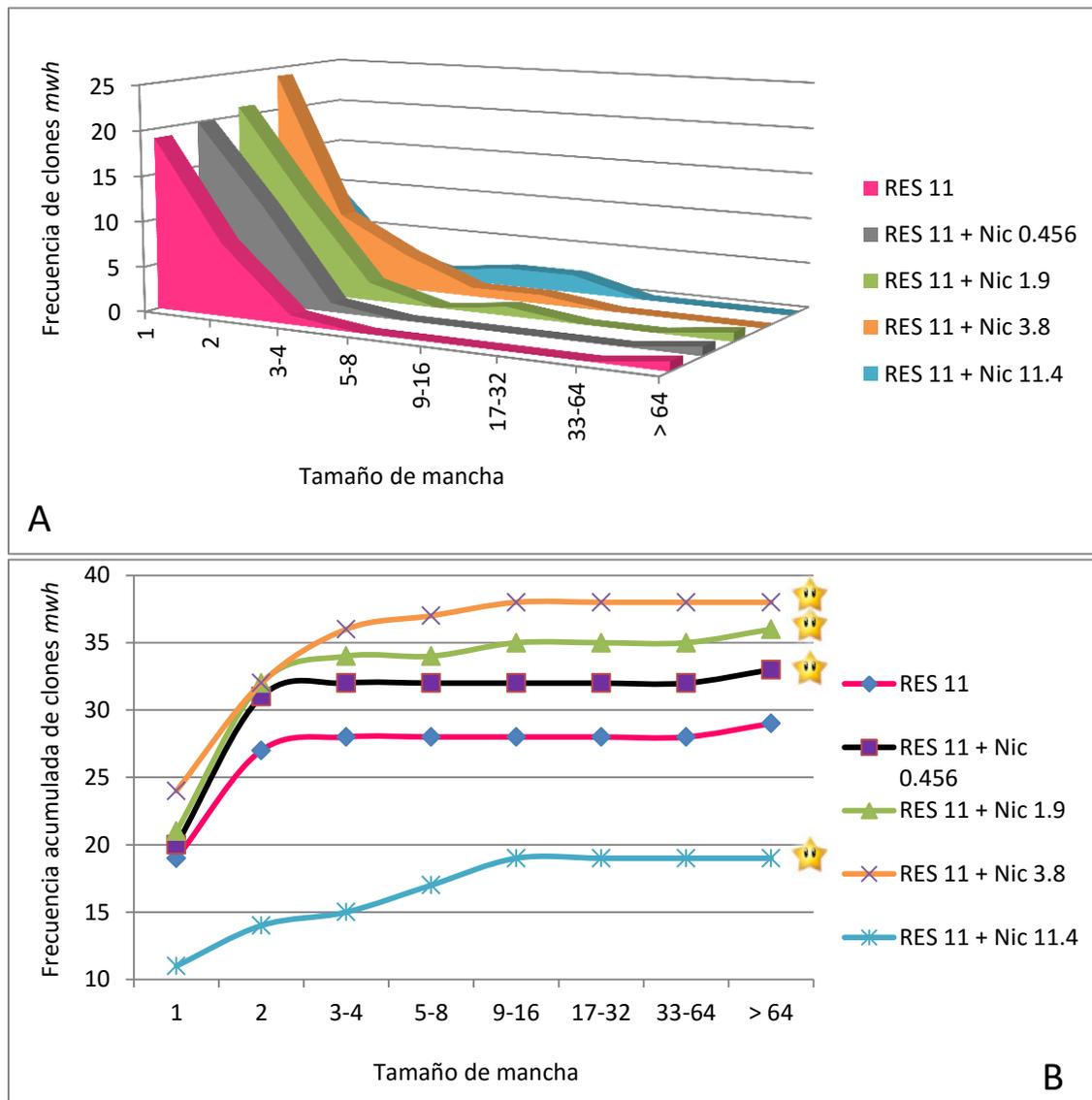


Fig. 27. A. Distribución de clones *mwh* de los co-tratamientos RES 11 μM + NIC contra su respectivo testigo de RES, de acuerdo al número de células mutadas en una mancha. **B.** Comparación de la frecuencia acumulada de clones de éstos, utilizada para el análisis estadístico. Las estrellas representan los tratamientos que presentaron diferencias significativas en la distribución de clones.

Discusión

“I wonder how, I wonder why...”
Fools Garden
Lemon Tree

La concentración más alta de NIC (11.4 mM) utilizada en este trabajo equivale a 3.7 mg/mL, que es similar a lo que contiene un cigarrillo estándar (3.24 mg), de acuerdo al análisis que se realizó de manera paralela a este trabajo (Tabla 1). Aunque se desconoce la cantidad que consumieron las larvas durante el experimento (pero sí la concentración a la que estaba en su alimento), ni la cantidad exacta de NIC a la que se expone una persona de un cigarrillo (sea pasiva o activa), se sabe que la nicotina puede entrar vía cutánea tanto en humanos (como el uso de parches) como en *D. melanogaster* (Velazquez-Ulloa, 2017), por lo que las larvas que fueron sometidas a la concentración de 11.4 mM estuvieron expuestas a cantidades de NIC a los que estaría expuesta un humano de manera crónica.

La alta mortalidad encontrada (Figura 14), sobre todo en la concentración más alta [11.4 mM], puede explicarse porque la NIC genera especies reactivas de oxígeno (ROS) (Yamamoto y Casida, 1999; Jain y Flora, 2012; Marriage *et al.*, 2014) y radicales libres (Wetscher *et al.*, 1995; Guo *et al.*, 2013) que tienen un efecto insecticida. En este trabajo se encontró un efecto dosis-respuesta en la mortalidad de los organismos, lo que coincide con Jain y Flora, quienes evaluaron en 2012 la producción de ROS en ratas a diferentes concentraciones de NIC encontrando un incremento proporcional de producción de ROS con respecto al aumento en la concentración de NIC. Por su par-

te, Krishnan *et al.*, encontraron en 2008 que la mortalidad de *D. melanogaster* aumentaba con respecto a la producción de ROS inducida por una exposición constante a H₂O₂.

Otra explicación sobre la mortalidad está relacionada con las reacciones en los nAChRs (Dajas-Bailador y Wonnacott, 2004; Ivannikov y Macleod, 2013). La NIC, al unirse a los nAChRs en las células Kenyon, induce la entrada de iones de calcio a la célula, y a su vez a la mitocondria (que también poseen nAChRs), obteniendo un efecto dosis-respuesta con respecto a estos niveles de Ca²⁺ y a la concentración de NIC (Campusano *et al.*, 2007; Ivannikov y Macleod, 2013; Leyton *et al.*, 2014). Altos niveles de calcio son tóxicos ya que promueven una hiperpolarización celular, induciendo apoptosis (Rizzuto *et al.*, 2003; Ivannikov y Macleod, 2013). Un segundo efecto de la entrada de altos nivel de Ca²⁺ es la producción de las ROS que, como se explicó anteriormente están relacionados con la toxicidad. Esta producción se da por dos posibles vías: 1) Fuera de la mitocondria, activa las quinasas C (PKCs), las cuales estimulan la producción de ROS con la ayuda de la NADPH oxidasa (Tsoyi *et al.*, 2011); y 2) dentro de la mitocondria, el Ca²⁺ modula la producción de las ROS mitocondriales producidas por la respiración celular, al haber un excedente de Ca²⁺, se incrementa la producción de las ROS en la mitocondria y salen de ella (Brookes *et al.*, 2004).

La genotoxicidad encontrada en la concentración más alta de NIC [11.4 mM] también está relacionada con un incremento en las ROS, ya que éstas, al entrar al núcleo se adhieren a una parte del DNA generando mutaciones, pérdida de expresión o síntesis de alguna proteína debido al daño causado a

un gen específico, también pueden generar deleciones, fragmentaciones, reordenamientos cromosómicos, entre otros (Venereo-Gutiérrez, 2002; Leandro *et al.*, 2015). Por otra parte, la estructura química de la NIC permite al compuesto atravesar la membrana celular y generar diversos daños entre los cuales se encuentran los ya mencionados al DNA (Crowley-Weber *et al.*, 2003; Barr *et al.*, 2007).

Las concentraciones menores de NIC [0.456, 1.9, 3.8 mM] no mostraron genotoxicidad, lo que contrasta con Sobkowlak y Lesicki (2009), quienes encontraron un efecto dosis-respuesta en la fragmentación del DNA por la NIC probada en el ensayo del cometa en *Caenorhabditis elegans*, empleando concentraciones de 0, 1, 10 y 100 μM , siendo esta última genotóxica.

Cabe señalar que se ha reportado que la NIC tiene una fuerte influencia en las sirtuinas (SIRTs), inhibiendo su metabolismo y generando que las células no puedan repararse (Lin *et al.*, 2012), ya que de las SIRTs dependen varios procesos celulares como la regulación del ciclo celular, resistencia al estrés oxidante y el silenciamiento de genes (Brunet *et al.*, 2004; Haigis y Sinclair, 2010; Lin *et al.*, 2012). Esto también podría explicar el efecto tóxico y genotóxico encontrado en este trabajo.

Las dos concentraciones de RES usadas en este trabajo modularon de diferente manera la toxicidad y genotoxicidad de las diversas concentraciones de la NIC, esto puede ser comparado con el trabajo de Lin *et al.* (2012) quien reportó que RES reguló el efecto oxidante de la NIC y previno el efecto teratogénico inducido por NIC en embriones de ratón. Con RES [0.28 μM] se obtuvo un aumento en la sobrevivencia ante la concentración 11.4 mM de

NIC, además de un efecto de sinergia en la genotoxicidad con NIC [1.9 y 3.8 mM]. Por su parte, RES [11 μ M] mostró mayor efecto protector ante la toxicidad de la NIC que el RES [0.28 μ M] y en la genotoxicidad de NIC [11.4 mM].

Estos efectos podrían deberse a distintos posibles factores:

1) **Las sirtuinas.** El RES está relacionado con varios procesos celulares como el alargamiento de la esperanza de vida del organismo, regulación del ciclo celular, resistencia al estrés oxidante, silenciamiento de genes y apoptosis, funciones que, como se mencionó anteriormente, forman parte del efecto de las SIRTs, descritas en diversos organismos como levaduras, insectos y mamíferos (Brunet *et al.*, 2004; Haigis y Sinclair, 2010; Lin *et al.*, 2012).

La SIRT1 (también conocida como Sir2 o dSir2, en *Drosophila*) promueve la supervivencia de los organismos después de ser sometidos a un estímulo de estrés oxidante, además de que induce la reparación de DNA (Gallo *et al.*, 2004; Haigis y Sinclair, 2010; Frankel *et al.*, 2011). Esto podría explicar la propiedad como antioxidante que tiene el RES (Xia *et al.*, 2010). Lin *et al.* (2012) reportó que la NIC disminuía la producción de la SIRT1, pero incrementaba en co-tratamiento con RES.

2) **El equilibrio entre oxidantes y antioxidantes.** Se debe tomar en cuenta que debe existir un balance entre los antioxidantes y los radicales libres en las células, para evitar el estrés oxidante que lleva a un daño celular (De la Fuente, 2002; Venereo-Gutiérrez, 2002), el cual a su vez, puede generar la muerte del organismo; por un lado, si hay un déficit de antioxidante, no se puede generar una “protección” suficiente contra los radicales libres en el organismo; y en caso contrario, dosis altas de antioxidantes también generan

radicales libres que actúan como pro-oxidantes que dañan el DNA (Skibola y Smith, 2000; Halliwell, 2006). Esto explica la sinergia genotóxica provocada por los co-tratamientos de las concentraciones bajas de NIC [0.456, 1.9 y 3.8 mM] con las dos concentraciones de RES. Este desbalance también explicaría la razón por la cual RES [11 μ M] mostró tener un efecto genotóxico por sí mismo, además de que aumentó el daño en co-tratamiento con las concentraciones intermedias de NIC [1.9 y 3.8 mM]. Esto coincide con trabajos previos del laboratorio (Gómez-López, 2013).

Se ha demostrado que un excedente de RES inhibe la respiración mitocondrial, incrementando la producción de ROS (Madrigal-Pérez y Ramos-Gómez, 2016), lo cual pudo generar la genotoxicidad encontrada en este trabajo. Un efecto pro-oxidante también se ha reportado en otros trabajos como el de Martins *et al.*, quienes evaluaron en el 2014 el efecto citotóxico del RES a diferentes concentraciones (0.1, 1, 10 y 50 μ M) en células GRX, encontrando que a mayor concentración aumenta la producción de ROS, aumentando así el daño celular del RES.

Por otro lado, la protección obtenida con el co-tratamiento RES [11 μ M] + NIC [11.4 mM] podría explicarse de tres maneras:

- 1) Por protección del daño genotóxico, vía sirtuinas, disminuyendo el daño celular provocado por la NIC, lo cual coincide con el trabajo de (Lin *et al.*, 2012), quienes evaluaron la protección del resveratrol contra la teratogénesis inducida por NIC en embriones de ratón, además del posible balance entre agentes oxidantes y antioxidantes.

2) Por el balance apropiado entre el compuesto oxidante y el antioxidante.

3) Por el aumento del daño lo que generaría una selección de las células resistentes.

En resumen, se sabe que la NIC inhibe a la AChE la cual genera un sobre-estímulo del sistema nervioso central generando la mortalidad del organismo. La NIC se adhiere a los nAChRs de la membrana celular y mitocondrial generando la entrada masiva de iones de Ca^{2+} , los cuales generan a las ROS vía las PKCs o vía mitocondrial. Las ROS entran al núcleo y generan 8-oxodG que provoca daño genético, el cual puede ser reparado por las SIRT6. La NIC inhibe a las SIRT6 evitando la reparación celular provocando efectos tóxicos y genotóxicos del organismo. El RES, por su parte, como antioxidante inhibe a las ROS evitando el daño al DNA, y también promueve a las SIRT6 contrarrestando el efecto tóxico y genotóxico de la NIC. Se propone un esquema para entender la interacción entre la NIC y el RES (Figura 28).

Es por ello que debe ser muy importante el balance entre ambos compuestos. Si hay más agentes oxidantes (NIC y ROS) y poco antioxidante (RES), este último no sería suficiente para proteger a la célula de los daños tóxicos y genotóxicos. Por otra parte, si las SIRT6 fuesen inhibidas por la NIC, debería haber una proporción adecuada del RES para activar la misma cantidad de

SIRT6, de manera que se pudiera llevar a cabo la reparación celular. Sin embargo, un excedente de antioxidante (RES), generaría el efecto contrario al esperado y empezaría a funcionar como un pro-oxidante.

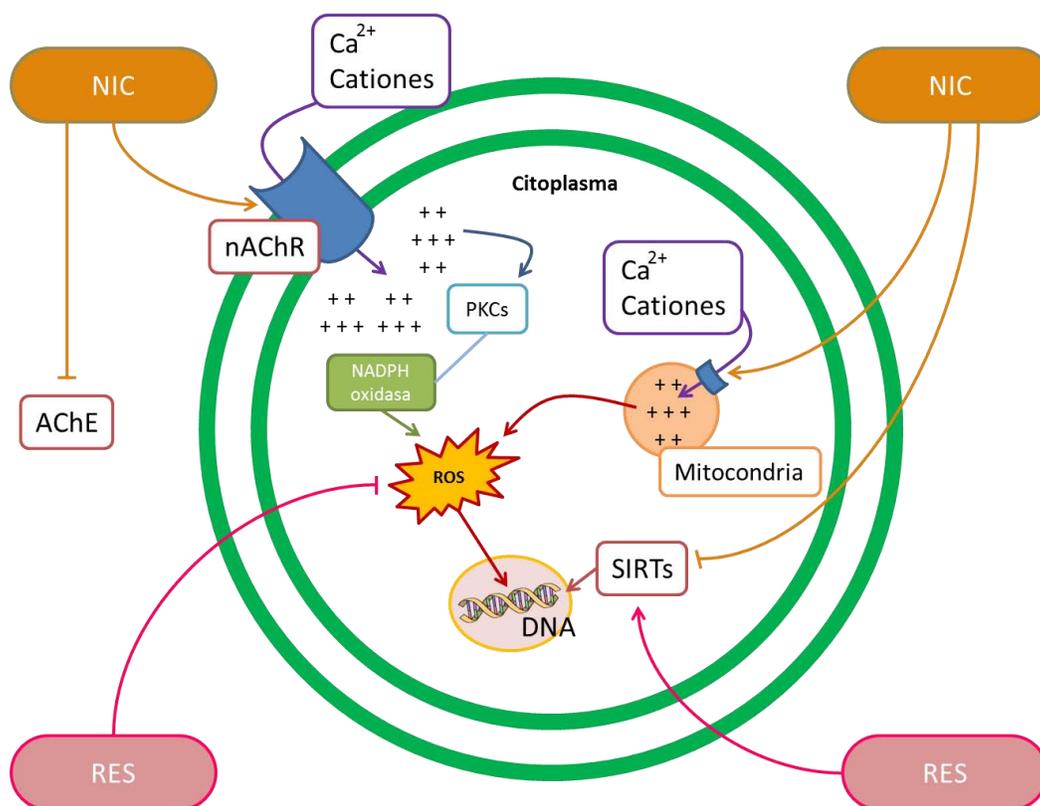


Fig. 28. Esquema propuesto de las reacciones ocurridas en el organismo durante su exposición al co-tratamiento de NIC, RES y NIC + RES.

Conclusiones

“Lo que no te cuesta no te sabe”, y esto me supo mucho

B. Gómez Loza



La NIC presentó un efecto concentración-respuesta en la mortalidad de las larvas.



Los co-tratamientos de NIC + RES [0.28 μ M] redujeron la mortalidad respecto a sus testigos NIC.



La NIC resultó ser genotóxica únicamente a la concentración de [11.4 mM], y alteró la distribución del tamaño de los clones *mwh* desde la concentración de [3.8 mM], lo cual indica un efecto en la división celular de las células de los discos imaginales del ala.



Se confirmó el efecto genotóxico de RES [11 μ M] reportado por Gómez-López (2013), mientras que RES [0.28 μ M] no mostró este efecto.



Ambas concentraciones de RES alteraron la distribución del tamaño de los clones *mwh*, y por lo tanto la división celular de las células de los discos imaginales del ala.



Los co-tratamientos de NIC + RES [0.28 μ M] incrementaron, de manera significativa, la frecuencia de clones mutantes en NIC [11.4 mM] y NIC [1.9 mM] resultó genotóxica en este co-tratamiento.



En los co-tratamientos de NIC + RES [11 μ M], el antioxidante disminuyó la mortalidad de los organismos y el efecto genotóxico de NIC [11.4 mM]. Por otro lado, RES [11 μ M] aumentó la genotoxicidad de NIC [0.456, 1.9 y 3.8 mM].



Es muy importante mantener el balance entre ambos compuestos. Si hay más agentes oxidantes (NIC y ROS) y poco antioxidante (RES), este último no sería suficiente para proteger a la célula de los daños tóxicos y genotóxicos, pero un excedente de antioxidante generaría el efecto contrario al esperado y empezaría a funcionar como un pro-oxidante.

Anexo 1

Metabolismo Xenobiótico

Un compuesto xenobiótico es todo aquel que viene del exterior del cuerpo y que puede ser sintético o de origen natural (por ejemplo, el producido por microorganismos, plantas, animales, hongos, etcétera y todos los seres vivos, a lo largo de nuestra vida, estamos expuestos a agentes xenobióticos que ingresan a nuestro cuerpo en forma de medicamentos, alimentos, bebidas, incluso del ambiente (Schwab, 2001).

A pesar de que todas las células tienen cierta capacidad de llevar a cabo el metabolismo xenobiótico, o biotransformación (Schwab, 2001), este proceso ocurre, principalmente, en el hígado y consiste en transformar los agentes xenobióticos en compuestos hidrosolubles para que el cuerpo pueda desecharlos de mejor manera, evitando así que el compuesto se acumule y pueda llegar a niveles tóxicos (Bello-Gutiérrez y López-de-Cerain-Salsamendi, 2001). También confiere protección de algunos compuestos endógenos originados, por ejemplo, los producidos a través de una interacción con las ROS (Schwab, 2001).

Cuando un xenobiótico entra en el organismo, pueden ocurrir tres posibles respuestas (Bello-Gutiérrez y López-de-Cerain-Salsamendi, 2001; Schwab, 2001):

1. Que sea excretado directamente sin ser transformado, en caso de ser hidrofílico.

2. Que aumente su polaridad durante el metabolismo lo que permite eliminarlo.
3. Que su actividad tóxica cambie, hay ocasiones, en que, durante la transformación estructural del compuesto, puede que ésta disminuya (es decir, detoxificación), pero hay otras en las que la toxicidad aumente (es decir, bioactivación)

El metabolismo xenobiótico consta de 2 a 3 fases, dependiendo de la especie, ya que la tercera corresponde a la excreción. A continuación se explica cada fase:

 Fase 1: Es el primer paso en el metabolismo de xenobióticos en el cual se expone o se agrega un grupo funcional en la estructura del compuesto gracias a la participación, mayoritariamente, de los citocromos P450, dichos grupos funcionales pueden ser: -SH, -OH, -NH₂, -COOH (Schwab, 2001). En esta fase intervienen la oxidación, la reducción y la hidrólisis (Bello-Gutiérrez y López-de-Cerain-Salsamendi, 2001)

 Fase 2. Una vez que el compuesto se ha hecho polar o más polar, ocurre un segundo cambio químico, normalmente en la misma región donde fue introducido o expuesto el grupo funcional (Schwab, 2001). En esta fase se llevan a cabo reacciones de conjugación las cuales son catalizadas por enzimas tales como la enzima glutatión S-transferasa, N-acetiltransferasa, sulfotransferasa y UDP-

glucuronosil transferasa (Bello-Gutiérrez y López-de-Cerain-Salsamendi, 2001; Schwab, 2001).



Fase 3. Después de pasar por fase 1 y 2, el compuesto puede ser excretado más fácilmente. Los principales transportadores que se encuentran en esta fase son la P-glicoproteína (P-gp), las proteínas asociadas a la Resistencia de multifármacos (*multidrug resistance-associated proteins* –MRPs–) y las OATP2 (por sus siglas en inglés: *Organic Anion Transporting Polypeptide 2*), los cuales son expresados en diferentes tejidos como el hígado, intestino, riñón y cerebro, lo que permite absorber, distribuir y excretar los compuestos (Xu *et al.*, 2005).

Cabe mencionar que las fases no siguen, necesariamente, la ruta de biotransformación de todos los químicos ya que hay compuestos que no necesitan de la modificación en fase 1, sino que pasan directamente a fase 2, del mismo modo que hay otros compuestos que pasan más de una ocasión por las reacciones de fase 2 (Schwab, 2001)

Sin embargo, a pesar de que este proceso es clave para la desintoxicación de determinados compuestos orgánicos, esta reacción puede generar también la bioactivación de los reactivos que interactúan con macromoléculas vitales de la célula, como el DNA, éstos pueden tener efectos mutagénicos o genotóxicos (Sarasquete y Segner, 1999). La aparición de cambios puede

ser reparable o irreversible, en caso de la manifestación de daños celulares, a veces conduce a la muerte celular (Bello-Gutiérrez y López-de-Cerain-Salsamendi, 2001).

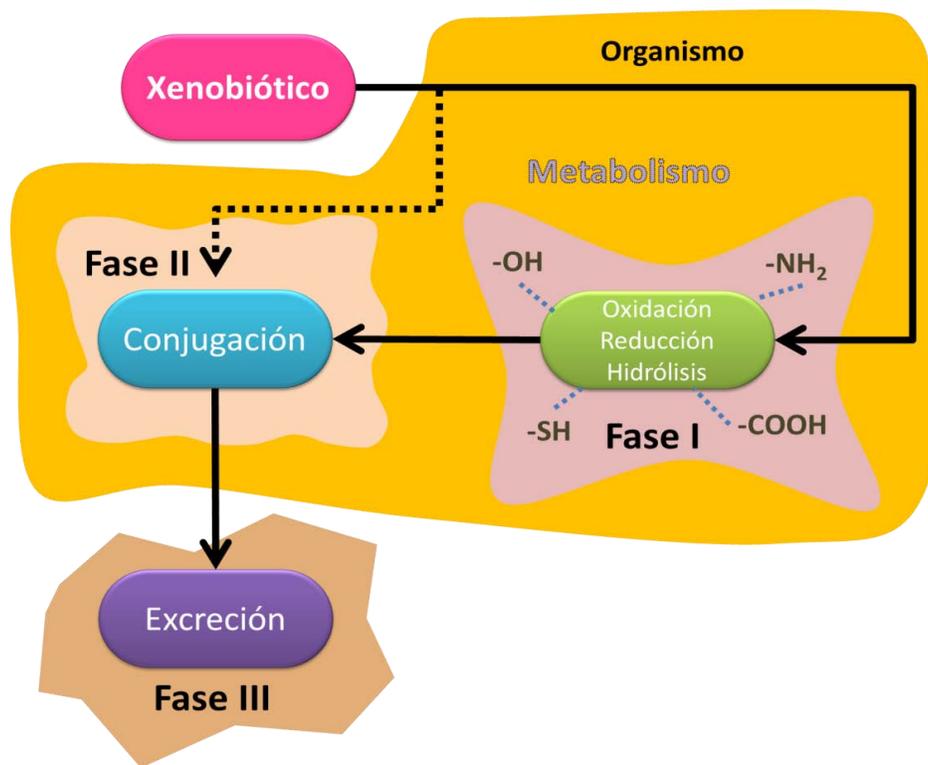


Fig. 29. Panorama general de las posibles rutas que puede tener un agente xenobiótico dependiendo de su polaridad.

Anexo 2

Análisis de tres cigarros comerciales de tabaco con colilla en espectrometría de masas

Se analizaron tres marcas comerciales de cigarrillos con filtro por espectrometría de masas para evaluar la cantidad de NIC contenida en ellos y, aproximadamente (dado que no todos los fumadores lo hacen de la misma manera), cuánto se puede retener en la colilla durante su consumo.

Para esto, se utilizaron dos cigarrillos de la misma cajetilla por cada marca, para garantizar que fueran del mismo lote. Uno de ellos fue conservado íntegro para cuantificar el contenido de nicotina en el tabaco. El otro fue consumido y posteriormente se analizó el filtro.

Las tres marcas de cigarrillos fueron consumidas por la misma persona, para controlar la mayor cantidad de factores que pudieran afectar el resultado del análisis. Posteriormente, se pesó el producto de los cigarros sin consumir, sin tomar en cuenta el filtro ni el papel en el que vienen envueltos. También fueron pesados los filtros (o colillas) de los cigarros que fueron consumidos. (Tabla 12).

Para la extracción de la NIC del cigarrillo se emplearon tres cigarrillos y metanol (metOH) absoluto con grado HPLC. A cada colilla se le agregaron 5 mL de metOH y para el tabaco se emplearon 15 mL. (Figura 30), para obtener una alícuota que se introdujo al equipo de espectrometría de masas. Para los cigarrillos 1 y 3, se empleó una alícuota de 3 μ L de la extracción de su conte-

nido (T1, T3) y 2 μL de la extracción de la colilla (C1, C3); para el cigarrillo 2, se tomaron 2 μL de ambas extracciones (T2 y C2).

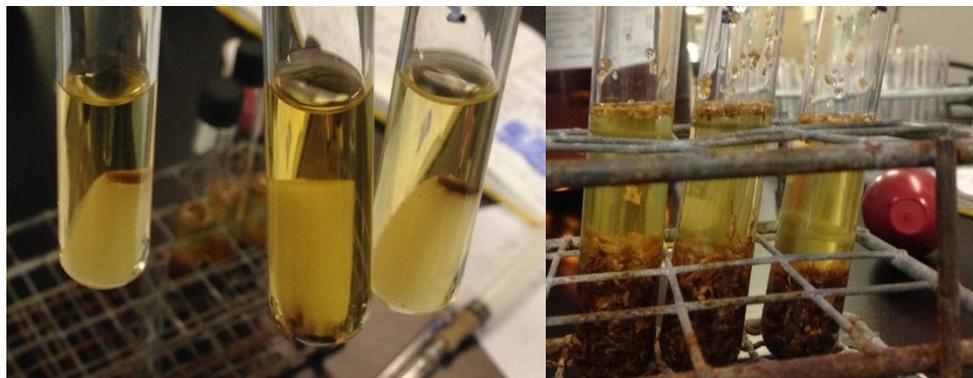


Fig. 30. Muestras de tres marcas de cigarrillos en metOH grado HPLC, las colillas del producto consumido (izq.) y el producto sin consumir (der.)

Para la alícuota de NIC (que se empleó para estandarizar el análisis), se tomaron 20 μL de la NIC, ésta se diluyó en 180 μL de metOH grado HPLC y, al detectarse una alta concentración en el equipo, se volvió a diluir tomando 1 μL a la cual se le agregaron 9 μL de metOH grado HPLC. De esta solución, se tomó una alícuota final de 1 μL para introducirla en el equipo de espectrometría (STD 99%).

Tabla 12. Peso de la colilla y tabaco de 3 marcas comerciales

Muestra	Colilla (g)	Cigarro (g)
Marca 1	0.1107	0.5914
Marca 2.	0.13	0.6755
Marca 3	0.115	0.5713

Cálculo de gramaje a partir de los resultados del análisis de espectrometría de masas

Para el cálculo de la cantidad de NIC en cada cigarro, se tomó como estándar la dilución que se realizó de la NIC en metOH. Considerando esto y que la densidad del agua es de 1.01, se calcula que contiene 9.9 µg en esa dilución, dicho peso corresponde a un área de espectro determinada (en este análisis fue de 429428378) y, a partir de ese dato, se obtuvieron las demás cantidades de NIC en cada muestra.

Tabla 13. Cálculo de las cantidades de NIC por cada muestra. N/A = No Aplica

Muestra	mg x Alícuota	mg x Colilla	mg x Cigarro
STD 99%	0.009999	N/A	N/A
C1	0.00054407	0.9068	N/A
C2	0.00019177	0.4794	N/A
C3	6.8232E-05	0.1137	N/A
T1	0.00029725	N/A	2.2294
T2	0.00036497	N/A	2.7373
T3	0.0004317	N/A	3.2378

Tabla 14. Cálculo de NIC por gramo de Cigarro

Muestra	Peso Tabaco (mg)	NIC x cigarro (mg)	NIC x g de Tabaco (mg)
Marca 1	591.4	2.2294	3.7697
Marca 2	675.5	2.7373	4.0522
Marca 3	571.3	3.2378	5.6674

Tabla 15. Porcentaje de NIC a la que está expuesta una persona fumadora activa o pasiva durante la consumo del cigarrillo. Este valor es un aproximado ya que varía la manera de fumar del consumidor activo, y de la cantidad que inhale el consumidor pasivo,

Muestra	NIC en Tabaco (mg)	NIC en Colilla (mg)	Diferencia (mg)	%
Marca 1	2.2293	0.9067	1.3226	59.328
Marca 2	2.7372	0.4794	2.2578	82.4857
Marca 3	3.2378	0.1137	3.1241	96.4883

Anexo 3

Ciclo de Vida de *Drosophila melanogaster*

Para describir el ciclo de vida de la mosca se puede empezar con la eclosión de su huevo y la salida de la larva (que es el primer estadio), pasando por dos estadios larvales más, en los cuales va aumentando gradualmente de tamaño, después se convierte en pre-pupa y, posteriormente, en pupa para dar origen al adulto después de la metamorfosis (Wolpert *et al.*, 2009) (Figura 31).

El tiempo que dura este proceso de huevo a adulto puede variar dependiendo de las condiciones en que se encuentre el organismo, desde 10 días a 25 ± 2 °C y a 65% de humedad relativa, hasta dos semanas a 21°C (Castañeda-Partida *et al.*, 2008).

Una hembra puede poner de 600 a 800 huevos a lo largo de su vida, aproximadamente 100 por día (Sang, 2001). En este huevo fecundado el embrión presenta un desarrollo embrionario temprano (20 h) en el que se forman los discos imaginales (Castañeda-Partida *et al.*, 2008). Cada disco imaginal va a dar lugar a diferentes estructuras del organismo adulto, las cuales pueden ser las alas, los apéndices, los ojos, entre otros (Whittle y Buratovich, 2001) (Figura 32).

La larva eclosiona siendo denominada como de “primer estadio” (24 h), seguido por el “segundo estadio” (48 h) y, por último, el “tercer estadio” de (72 h) (Schäfer y Jäckle, 2000) en las cuales la ingesta de alimento es constante hasta que llega la etapa de pre-pupa (96 h) que es cuando empieza su

transformación a pupa (120 h), durante la cual ocurre la metamorfosis que permite la diferenciación celular de los discos imaginales, y, después de 5 días (240 h) emerge el imago que es una mosca con cuerpo blanquecino y las alas no están muy desarrolladas (éstas se encuentran enrolladas en el dorso), las cuales se endurecerán y su cuerpo se oscurecerá terminando así, minutos más tarde, su desarrollo a adulto viviendo de este modo entre 40 y 60 días (Castañeda-Partida *et al.*, 2008).

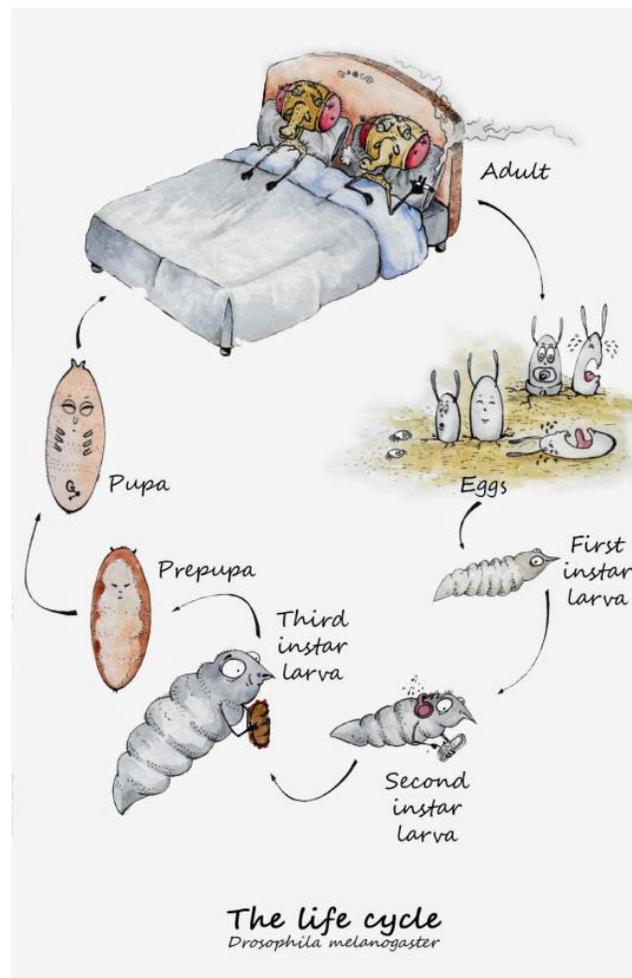


Fig. 31. Ciclo de vida de *D. melanogaster*. Imagen tomada de <https://asociacionconciencia.files.wordpress.com/2016/07/lifecycle.jpg?w=540>

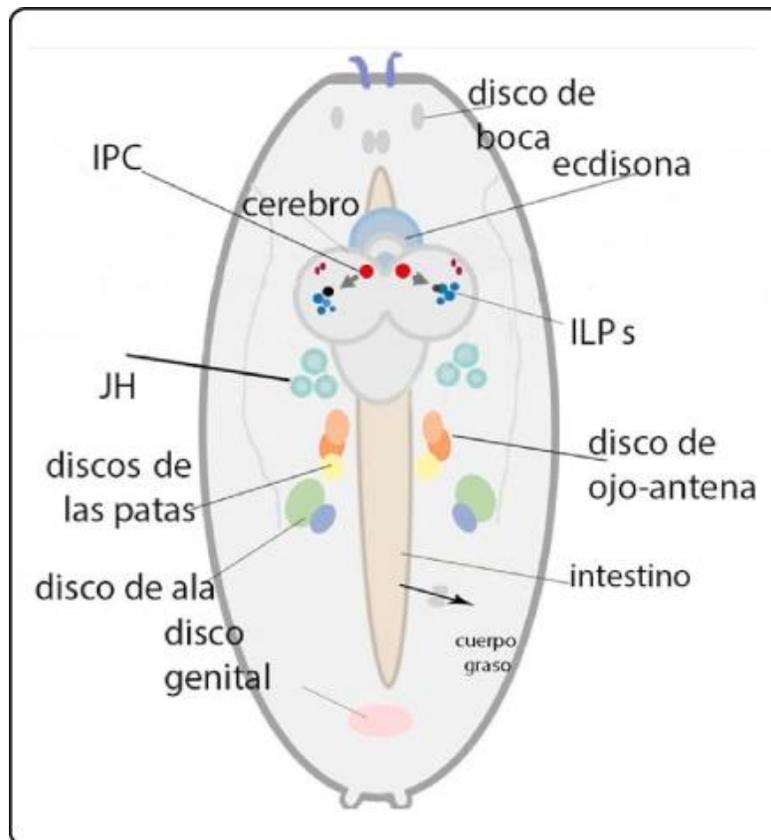


Fig. 32. Esquema de la larva de *D. melanogaster* mostrando los discos imaginarios que darán forma a sus respectivas estructuras. Imagen tomada de (Otero-Moreno *et al.*, 2016). IPC, células secretoras de péptidos parecidos a la insulina (ILPs) y hormonas juveniles (JH).

Anexo 4

Medio de Levadura Fresca Activada

Para la elaboración del medio de levadura se requiere de:

-  1 barra de levadura fresca Florida®
-  2 cucharadas de azúcar
-  Agua
-  Baño María

Se pulveriza la barra de levadura y se pone el azúcar. Se le agrega de poco a poco el agua cuidando que la consistencia sea espesa.

La mezcla se coloca en baño María durante 5 minutos, en los cuales se puede dejar en reposo o seguir mezclando suavemente, esto es con el fin de que pierda humedad. Si la mezcla pierde demasiada agua, se sigue humedeciendo poco a poco con el fin de mantener una misma consistencia. Terminados los 5 minutos, se pone otros 5 minutos fuera del baño María. Esto se repite otras dos veces.

Cuando termine la tercera y última puesta en baño María, la consistencia idónea del medio es el punto de listón o punto de betún. Figura 33.



Fig. 33. Medio de levadura fresca activada terminado.

Cuando se encuentra en este punto, se pasa a los frascos de 250 mL. La mezcla se distribuye en 8 frascos, o hasta 12. Se procuró colocar levadura en las paredes de los frascos, ya que descubrimos que las moscas dejaban una mayor cantidad de huevos en la pared que en el fondo del frasco (Figura 34).



Fig. 34. Colocación del medio de levadura en los frascos de cultivo.

Se realizó el video nombrado “*Activación de Levadura Fresca Activada (...)*” donde se puede seguir de mejor manera la realización del medio de cultivo, el cual se puede encontrar en cualquiera de las siguientes direcciones web:



<https://www.youtube.com/watch?v=Pju8mAmZhwQ>



<http://mediacampus.cuaed.unam.mx/node/5680>

Anexo 5

Análisis Estadístico

Frei y Würigler diseñaron en 1988 un programa estadístico llamado SMART PC-versión 2.1, el cual está basado en la prueba no paramétrica de χ^2 de proporciones (una cola) con la corrección de Yates, con un grado de libertad y $\alpha = \beta = 0.05$, para evaluar si hay, o no, diferencias significativas y discutir los parámetros que pueden afectar un experimento, así como decidir si los resultados indican un resultado positivo, débil positivo, negativo o indeciso; teniendo como hipótesis nula (H_0) que el tratamiento experimental no incrementa la frecuencia de la expresión de manchas obtenida en el testigo a comparar (en este caso cada testigo disolvente, así como los testigos NIC y RES); mientras que la hipótesis alterna (H_a) se refiere a que el tratamiento experimental incrementó por un cierto número de múltiplo (ρ^2) la frecuencia obtenida en el testigo positivo.

Cuando se rechaza H_a después de la análisis, nos dice que no existieron diferencias significativas entre los tratamientos experimentales (en este trabajo, los co-tratamientos y testigos NIC y RES) y los testigos (agua milliQ, etOH 2% y los respectivos testigos NIC y RES).

Los posibles resultados generados por este problema son los siguientes:

1. Se acepta **H_0** y se rechaza **H_a** : **negativo (-)**.
2. Se rechaza **H_0** y se acepta **H_a** : **positivo (+)**.
3. Se rechaza **H_0** y se rechaza **H_a** : **débil positivo (w)**.
4. Se acepta **H_0** y se acepta **H_a** : **indeciso (i)**.

Se recomienda, para obtener un resultado confiable, un tamaño de muestra óptima de 55 organismos por tratamiento (Frei y Würigler, 1995). Sin embargo, en este trabajo, no se logró obtener los 55 organismos en algunos

tratamientos debido a la alta toxicidad del compuesto (como fue el caso de NIC [11.4 mM]).

Para los resultados indecisos o débiles positivos, se emplea la prueba de U de Mann-Whitney y Wilcoxon, ya que considera la variación entre individuos y necesita de una distribución normal de los datos.

En el caso del análisis de distribuciones del tamaño de clones *mwh*, se utilizó la prueba de Kolmogorov-Smirnov (K-S), la cual permite medir la concordancia entre dos distribuciones empleando sendas frecuencias de manchas acumuladas (Graf *et al.*, 1984).

Esta prueba se realizó con la asesoría del profesor Ángel Durán Díaz, del laboratorio de Matemáticas de la FES Iztacala UNAM empleando el programa estadístico STAT-Graphics versión 6.0, con $p \leq 0.05$.

“Nunca es demasiado tarde para ser lo que debiste haber sido”

George Elliot

Literatura citada

ABC Salud, (22 de Diciembre de 2014). *Explican por qué el vino tinto es beneficioso para la salud*. [En línea]

Disponible en: <http://www.abc.es/salud/noticias/20141222/abci-vino-tinto-resveratorl-estres-201412221315.html>

[Último acceso: 4 Mayo 2017].

Abel, E. L., (1986). *Marihuana, Tabaco, Alcohol y Reproducción*. Madrid, España: Díaz de Santos.

Ahmad, A., Syed, F. A., Singh, S. y Hadi, S. M., (2005). Prooxidant activity of resveratrol in the presence of copper ions: Mutagenicity in plasmid DNA. *Toxicology Letters*, 159, pp. 1-12.

Ali, S., (2012). *Nicotinic acetylcholine receptors; an examination of expression and insecticide interactions in Drosophila melanogaster*. PhD Tesis, EUA: The University of Melbourne.

Almeida, L. *et al.*, (2009). Pharmacokinetic and safety profile of trans-resveratrol in a rising multiple-dose study in healthy volunteers. *Molecular Nutrition and Food Research*, 53(1), pp. 7-15.

Arboleda-Moreno, Y., Hoyos, L. S., Carvajal, S. y Sierra-Torres, C. H., (2004). Genotoxicidad por exposición a cigarrillos en fumadores jóvenes en Colombia. *Revista Panamericana de Salud Pública*, 6(15), pp. 367-372.

Barr, J. *et al.*, (2007). Nicotine induces oxidative stress and activates nuclear transcription factor kappa B in rat mesencephalic cells. *Molecular Cell Biochemistry*, 1-2(297), pp. 93-99.

Bello-Gutiérrez, J. y López-de-Cerain-Salsamendi, A., (2001). *Fundamentos de Ciencia Toxicológica*. España: Díaz de Santos.

Benowitz, N. L., Hukkanen, J. y Jacob III, P., (2009). Nicotine Chemistry, Metabolism, Kinetics and Biomarkers. *Handbook of Experimental Pharmacology*, 192, pp. 29-60.

Bettelheim, F. A., Campbell, M. K. y Farrell, S. O., (2010). *Introduction to General, Organic and Biochemistry*. 9a ed. Canadá: Books/Cole, Cengage Learning.

Borek, C., (1997). Antioxidants and Cancer. *Science and Medicine*, 4(6), pp. 52-61.

- Boticario-Boticario, C. y Cascales-Angosto, M., (2008). *Innovaciones en cáncer*. Madrid: Universidad Nacional de Educación a Distancia.
- Brookes, P. S. *et al.*, (2004). Calcium, ATP, and ROS: a mitochondrial love-hate triangle. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, 287(4), pp. C817-C833.
- Brown, L. A. *et al.*, (2006). Neonicotinoid insecticides display partial and super agonist actions on native insect nicotinic acetylcholine receptors. *Journal of Neurochemistry*, 99(2), pp. 608-615.
- Brunet, A. *et al.*, (2004). Stress-Dependent Regulation of FOXO Transcription Factors by the SIRT1 Deacetylase. *Science*, Volumen 303, pp. 2011-2015.
- Buckingham, S. D., Jones, A. K., Brown, L. A. y Sattelle, D. B., (2009). Nicotinic Acetylcholine Receptor Signalling: Roles in Alzheimer's Disease and Amyloid Neuroprotection. *Pharmacological Reviews*, 61(1), p. 39_61.
- Campusano, J. M. *et al.*, (2007). nAChR-Mediated Calcium Responses and Plasticity in *Drosophila* Kenyon Cells. *Developmental Neurobiology*, 11(67), pp. 1520-1532.
- Castañeda-Partida, L., Heres-Pulido, M. E. y Dueñas-García, I. E., (2008). *Drosophila melanogaster: Un Modelo Experimental*. México, México: Universidad Nacional Autónoma de México.
- Castañeda-Partida, L., (2002). *Valoración Genotóxica del Acetato de Plomo y la Dimetilnitrosamina (DMN) en las cruas AB y ST de Drosophila melanogaster Pretratadas con Fenobarbital, Mediante la Prueba de SMART*. Tesis de Maestría en Ciencias. Distrito Federal, México: Fac. de Ciencias. UNAM.
- Challem, J., (2008). *Antioxidantes naturales: Cómo reducir el riesgo de cáncer, alzheimer y enfermedades cardiovasculares..* España: Nowtilus S.L..
- Challem, J. y Block, M., (2008). *Antioxidantes naturales*. España: Nowtilus.
- Crespo-Santiago, D., (2006). *Biogerontología*. Cantabria: Universidad de Cantabria.
- Crowley-Weber, C. L. *et al.*, (2003). 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. *Chemico-Biological Interactions*, 145, pp. 53-66.
- Dajas-Bailador, F. y Wonnacott, S., (2004). Nicotinic acetylcholine receptors and the regulation of neuronal signalling. *Trends Pharmacology Science.*, 25(6), pp. 317-324.

De la Fuente, M., (2002). Effects of antioxidants on immune system ageing. *European Journal of Clinical Nutrition*, 56, pp. 55-58.

Dueñas-García, I. E., (2002). *Efecto Mutagénico y Recombinogénico de la O-Fenilenediamina Mediante la Prueba de Mutación Somática en Alas de Drosophila melanogaster Cruzas E y AB*. Tesis para grado de Maestría en Ciencias. Distrito Federal, México: Fac. de Ciencias. UNAM.

Dueñas, I., Heres, M., Castañeda, L. y Graf, U., (2002). Easy raising of *Drosophila melanogaster* on a medium consisting of mashed potato flakes and a preservative solution. *Drosophila Information Service*, 84, p. 166.

Edderkaoui, M. y Thrower, E., (2013). Smoking and Pancreatic Disease. *Journal of Cancer Therapy*, 10A(4), pp. 34-40.

Egleton, R. D., Brown, K. C. y Dasgupta, P., (2007). Nicotinic Acetylcholine Receptor in Cancer: Multiple Roles in Proliferation and Inhibition of Apoptosis. *Trends in Pharmacological Sciences*, 29(3), pp. 151-158.

Feiner, A. S. *et al.*, (2011). Seizures and Other Neurological Symptoms Induced by Organophosphates, Including Warfare Nerve Agents. En: F. R. Tang y W. K. Loke, edits. *Chemical-Induced Seizures. Mechanism, Consequences and Treatments..* E.U.: Bentham Books, pp. 29-38.

Flybase, (2017). *Flybase*. [En línea] Disponible en: <http://flybase.org> [Último acceso: 25 Octubre 2017].

Frankel, S., Ziafazeli, T. y Rogina, B., (2011). dSir and longevity in *Drosophila*. *Exp Gerontol.*, 5(46), pp. 391-396.

Frei, H., Graf, U. y Würzler, F. E., (1998). Induced loss of heterozygosity in somatic cells of *Drosophila melanogaster* is a sensitive indicator of genotoxicity. *Toxicology Letters*, Volumen 95, p. 43.

Frei, H. y Würzler, F., (1995). Optimal experimental design and sample size for the statistical evaluation of data from somatic mutation and recombination tests (SMART) in *Drosophila*.. *Mutation Research*, 334(2), pp. 247-258.

Frei, H. y Würzler, F. E., (1988). Statistical methods to decide whether mutagenicity test data from *Drosophila* assays indicate a positive, negative, or inconclusive result. *Mutation Research*, Volumen 203, pp. 297-308.

Gallo, C. M., Smith, J. D. L. y Smith, J. S., (2004). Nicotinamide Clearance by Pnc1 Directly Regulates Sir2-Mediated Silencing and Longevity. *Molecular and Cellular Biology*, 24(3), pp. 1301-1312.

Gambini, J. *et al.*, (2015). Properties of Resveratrol: In Vitro and In Vivo Studies about Metabolism, Bioavailability, and Biological Effects in Animal Models and Humans. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2015, p. 13.

Geisler, B., (2011). *Resveratrol*. EUA: Green Press.

Gentry, C. L. y Lukas, R. J., (2002). Regulation of nicotine acetylcholine receptor numbers and function by chronic nicotine exposure. *Current Drug Targets CNS and Neurological Disorders*, 4(1), pp. 359-385.

Gómez-López, S. P., (2013). *Evaluación del efecto genotóxico del resveratrol en la prueba de mutación y recombinación omáticas en ala de Drosophila melanogaster cruzaa estándar (CE)*. Tesis de Licenciatura. México: Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM.

Gorrod, J. W. y Jacob III, P., (2002). *Analytical Determination of Nicotine and Related Compounds and Their Metabolites*. Amsterdam: Elsevier.

Graf, U. *et al.*, (1984). Somatic Mutation and Recombination Test in Drosophila melanogaster. *Environmental Mutagenesis*, 6, pp. 153-188.

Guo, L. *et al.*, (2013). Mitochondrial Reactive Oxygen Species Mediates Nicotine-Induced Hypoxia-Inducible Factor-1 α Expression In Human Non-Small Cell Lung Cancer Cells. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1822, pp. 852-861.

Gutiérrez-Maydata, A., (2003). Oxidantes en el humo del cigarro y enfermedades cardiopulmonares. *Revista Cubana de Medicina [online]*, 42(5), pp. 0-0.

Guzmán-Rincón, J. y Graf, U., (1995). Drosophila melanogaster somatic mutation and recombination test as a biomonitor. En: I. M. Butteworth, L. D. Corkum y J. Guzmán-Rincón, edits. *Biomonitoring and Biomarkers as Indicators of Environmental Change: a Handbook*. s.l.:Plenum Publishing Corp, pp. 169-181.

Haigis, M. C. y Sinclair, D. A., (2010). Mammalian Sirtuins: Biological Insights and Disease Relevance. *Annual Review of Pathology*, 5, pp. 253-295.

Halliwell, B., (2006). Reactive Species and Antioxidants. Redox Biology Is a Fundamental Theme of Aerobic Life. *Plant Physiology*, 2(141), pp. 312-322.

Hauling, T., (2011). *The Activation of the Insect Immune System by Endogenous Danger Signals with Emphasis on Drosophila melanogaster*. Tesis de Doktor der Naturwissenschaften. Alemania: Kassel University.

Henningfield, J. E., London, E. D. y Pogun, S., (2004). *Nicotine Psychopharmacology*. E.U.A.: Springer.

Ihara, M. *et al.*, (2007). A hypothesis to account for the selective and diverse actions of neonicotinoid insecticides at their molecular targets, nicotinic acetylcholine receptors: catch and release in hydrogen bond networks. *Invertebrate Neuroscience*, 7, pp. 47-51.

International Agency for Research on Cancer, (2007). *Smokeless Tobacco and Some Tobacco-Specific N-Nitrosamines*. Lyon: World Health Organization International Agency for Research on Cancer.

Ivannikov, M. V. y Macleod, G. T., (2013). Mitochondrial Free Ca²⁺ Levels and Their Effects on Energy Metabolism in Drosophila Motor Nerve Terminals. *Biophysical Journal*, 11(104), pp. 2353-2361.

Jain, A. y Flora, S. J., (2012). Dose related effects of nicotine on oxidative injury in young, adult and old rats. *Journal of Environmental Biology*, 2(33), pp. 233-238.

King, R. E., Bomser, J. A. y Min, D. B., (2006). Bioactivity of Resveratrol. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 5, pp. 65-70.

Kleinsasser, N. H. *et al.*, (2005). The Tobacco Alkaloid Nicotine Demonstrates Genotoxicity in Human. *Toxicological Science*, 27 Abril, 86(2), pp. 309-317.

Koh, K., Evans, J. M., Hendricks, J. C. y Sehgal, A., (2006). A Drosophila model for age-associated changes in sleep: wake cycles. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(37), p. 13843–13847.

Krishnan, N., Davis, A. J. y Giebultowicz, J. M., (2008). Circadian regulation of response to oxidative stress in Drosophila melanogaster. *Biochemical Biophysical Research Communication*, 374(2), pp. 299-303.

Kubota, T., Uemura, Y., Kobayashi, M. y Taguchi, H., (2003). Combined effects of resveratrol and paclitaxel on lung cancer cells. *Anticancer Research*, 5A(23), pp. 4039-4046.

LCI Bogotá / LCI Barranquilla, 12 de Mayo 2011. *RESVERATROL: EL ELIXIR DE LA ETERNA JUVENTUD EN UNA COPA DE VINO*. [En línea] Disponible en: <http://blog.lci.edu.co/?p=63> [Último acceso: 4 Mayo 2017].

- Leandro, G. S., Sykora, P. y Bohr, V. A., (2015). The Impact of Base Excision DNA Repair in Age-Related Neurodegenerative Diseases. *Mutation Research: Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 776, pp. 31-39.
- Leyton, V., Goles, N. I., Fuenzalida-Uribe, N. y Campusano, J. M., (2014). Octopamine and Dopamine differentially modulate the nicotine-induced calcium response in Drosophila Mushroom Body Kenyon Cells.. *Neuroscience Letters*, 560, pp. 16-20.
- Li, H. y Garza, D., (2003). Drosophila as a Tool for Drug Discovery. En: P. M. Carroll y K. Fitzgerald, edits. *Model Organisms in Drug Discovery*. E.U.A: John Wiley & Sons, Ltd, pp. 81-118.
- Li, X. S. *et al.*, (1996). Genotoxicity Study On Nicotine and Nicotine-Derived Nitrosamine by Accelerator Mass Spectrometry. *Radiocarbon*, 38(2), pp. 347-353.
- Lin, B., (2006). *A Novel Resveratrol Analog: Its Cell Cycle Inhibitory, Pro-apoptotic and Anti-inflammatory Activities on Human Tumor Cells*. EUA: Kent State University.
- Lin, C. *et al.*, (2012). Resveratrol Prevents Nicotine-Induced Teratogenesis in Cultured Mouse Embryos. *Reproductive Toxicology*, 34, pp. 340-346.
- Linus Pauling Institute, 2015. *Resveratrol*. [En línea]
Disponible en: <http://lpi.oregonstate.edu/mic/dietary-factors/phytochemicals/resveratrol>
[Último acceso: Marzo 2017].
- Lozada, S. M. y Rueda, R., (2010). Envejecimiento cutáneo. *Revista de la Asociación Colombiana de Dermatología*, 18, pp. 10-17.
- Madrigal-Pérez, L. A. y Ramos-Gómez, M., (2016). Resveratrol Inhibition of Cellular Respiration: New Paradigm for an Old Mechanism. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(3), p. 368.
- Mai, H. *et al.*, (2003). A Functional Role for Nicotine in Bcl2 Phosphorylation and Suppression of Apoptosis. *The Journal of Biological Chemistry*, 278(3), pp. 1886-1891.
- Malaiyandi, V., Goodz, S. D., Sellers, E. M. y Tyndale, R. F., (2006). CYP2A6 Genotype, Phenotype, and the Use of Nicotine Metabolites as Biomarkers during Ad libitum Smoking. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 10(15), pp. 1812-1819.
- Malson, J. L., Sims, K., Murty, R. y Pickworth, W. B., (2001). Comparison of the nicotine content of tobacco used in bidis and conventional cigarettes. *Tobacco Control*, 10, pp. 181-183.

- Marriage, T. N., King, E. G., Long, A. D. y Macdonald, S. J., (2014). Fine-Mapping Nicotine Resistance Loci in *Drosophila* Using a Multiparent Advanced Generation Inter-Cross Population. *Genetics*, 198(1), pp. 45-57.
- Martins, L. A. M. *et al.*, (2013). Resveratrol Induces Pro-oxidant Effects and Time-Dependent Resistance to Cytotoxicity in Activated Hepatic Stellate Cells. *Cell Biochemistry and Biophysics*, 2(68), pp. 247-257.
- Martins, L. A. M. *et al.*, (2014). Resveratrol Induces Pro-oxidant Effects and Time-Dependent Resistance to Cytotoxicity in Activated Hepatic Stellate Cells. *Cell Biochem Biophys*, 68, pp. 247-257.
- Matsuoka, A. *et al.*, (2001). Resveratrol, a naturally occurring polyphenol, induces sister chromatid exchanges in a Chinese hamster lung (CHL) cell line. *Mutation Research*, 494, pp. 107-113.
- Messina, E. S., Tyndale, R. F. y Sellers, E. M., (1997). A Major Role for CYP2A6 in Nicotine C-Oxidation by Human Liver Microsomes. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 282(3), pp. 1608-1614.
- Monesteir, M., (1999). *Las Moscas: El peor enemigo del hombre*. Francia: Fondo de Cultura y Económica.
- Mora, R. J. F., (2002). *Soporte nutricional especial*. 3 ed. Colombia: Editorial Médica Panamericana.
- Muliaty, D., Yusuf, I., Setiabudy, R. y Wanandi, S. I., (2010). CYP2A6 gene polymorphisms impact to nicotine metabolism. *Medical Journal of Indonesia*, 19, pp. 46-51.
- Nuutinen, S., Ekokoski, E., Lahdensuo, E. y T. R. K., (2006). Nicotine-induced upregulation of human neuronal nicotinic $\alpha 7$ -receptors is potentiated by modulation of cAMP and PKC in SH-EP1- $\alpha 7$ cells. *European Journal of Pharmacology*, 544, pp. 21-30.
- OMS, (2014). *Organización Mundial de la Salud*. [En línea] Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/>. [Último acceso: 25 Marzo 2014].
- Opipari, A. W. *et al.*, (2004). Resveratrol-induced Autophagocytosis in Ovarian Cancer Cells. *Cancer Research*, 64, pp. 696-703.
- Otero-Moreno, D., Peña-Rangel, M. T. y Riesgo-Escovar, J. R., (2016). Crecimiento y Metabolismo: La Regulación y la Vía de la Insulina Desde la Mosca de la Fruta, *Drosophila melanogaster*. *TIP. Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, 19(2), pp. 116-126.

Pagano, T., Bida, M. R. y Robinson, R. J., (2015). Laboratory Activity for the Determination of Nicotine in Electronic Cigarette Liquids using Gas Chromatography-Mass. *Journal of Laboratory Chemical Education*, 3(3), pp. 37-43.

Palacios-López, C. S., (2014). *Evaluación del efecto del resveratrol en co-tratamiento con 4-NQO en SMART en ala de Drosophila melanogaster cruza estándar (CE)*. Tesis de Licenciatura. México: Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM.

Posgai, R. T., (2012). *Development of a Drosophila melanogaster model system for nanoparticle toxicity assessment*. Universidad de Dayton: Tesis Ph.D..

Potter, G. A. *et al.*, (2002). The cancer preventative agent resveratrol is converted to the anticancer agent piceatannol by the cytochrome P450 enzyme CYP1B1. *British Journal of Cancer*, 86, pp. 774-778.

Reiter, L. T. *et al.*, (2001). A Systematic Analysis of Human Disease-Associated Gene Sequences In *Drosophila melanogaster*. *Genome Research*, 6(11), p. 1114–1125.

Rizzuto, R. *et al.*, (2003). Calcium and Apoptosis: facts and hypotheses. *Oncogene*, 22, pp. 8619-8627.

Romero-Pérez, A. I., Lamuela-Raventós, R. M., Waterhouse, A. L. y de la Torre-Boronat, M. C., (1996). Levels of cis- and trans-Resveratrol and Their Glucosides in White and Rosé Vitis vinifera Wines from Spain. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44(8), pp. 2124-2128.

Roy, P. *et al.*, (2008). Chemopreventive Potential of Resveratrol in Mouse Skin Tumors Through Regulation of Mitochondrial and PI3K/AKT Signaling Pathways. *Pharmaceutical Research*, 26(1), pp. 211-217.

Ruddon, R. W., (2007). *Cancer Biology*. 4a ed. New York: Oxford University Press..

Sala, G. *et al.*, (2003). Resveratrol structure and ceramide-associated growth inhibition in prostate cancer cells. *Drugs Under Experimental and Clinical Research*, 5-6(2003), p. 29.

Sang, J. H., (2001). *Drosophila melanogaster: The Fruit Fly*. En: E. C. R. Reeve y I. Black, edits. *Encyclopedia of Genetics*. Chicago, EUA: Fitzroy Dearborn Publishers, pp. 157-.

Sarasquete, C. y Segner, H., (1999). Los Citocromos P-450. Distribución Tisular e Inducción Xenobiótica de CYP1A en la Biota Acuática. En: C. Sarasquete, M. L. González de Canales y J. A. Muñoz-Cueto, edits. *Patológica, Fisiología y Biotoxicología en especies acuáticas*. Madrid, España: Consejo Superior de Investigaciones Científicas, pp. 45-66.

- Schäfer, U. y Jäckle, H., (2000). *Drosophila melanogaster: A Genetic Tool*. En: M. Clark. *Comparative Genomics*. New York, E.U.: Springer Science+Business Media, pp. 23-42.
- Schmitt, E., Lehmann, L., Metzler, M. y Stopper, H., (2002). Hormonal and genotoxic activity of resveratrol. *Toxicology Letters*, 136, pp. 133-142.
- Schwab, M., (2001). *Encyclopedic Reference of Cancer*. Italia: Springer.
- Sherry-Chow, H.-H. et al., (2010). Resveratrol Modulates Drug and Carcinogen Metabolizing Enzymes in a Healthy Volunteer Study. *Cancer Prevention Research (Philadelphia)*, 9(3), pp. 1168-1175.
- Silva-Calzada, J., (2013). *Efecto modulador del resveratrol contra el promutágeno uretano con SMART en ala de Drosophila melanoogaster, cruza estándar (CE)*. Tesis de Licenciatura. México: Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM.
- Siminszky, B., Gavilano, L., Bowen, S. W. y Dewey, R. E., (2005). Conversion of nicotine to nornicotine in *Nicotiana tabacum* is mediated by CYP82E4, a cytochrome P450 monooxygenase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 41(102), pp. 14919-14924.
- Skibola, C. F. y Smith, M. T., (2000). Potential health impacts of excessive flavonoid intake. *Free Radical Biology and Medicine*, 29, pp. 375-383.
- Sobkowlak, R. y Lesicki, A., (2009). Genotoxicity of nicotine in cell culture of *Caenorhabditis elegans* evaluated by the comet assay. *Drug and Chemical Toxicology*, 32(3), pp. 252-257.
- Timbrell, J., (2002). *Introduction to Toxicology*. 3a ed. E.U.: CRC Press.
- Tsoyi, K. et al., (2011). Stimulation of alpha7 nicotinic acetylcholine receptor by nicotine attenuates inflammatory response in macrophages and improves survival in experimental model of sepsis through heme oxygenase-1 induction. *Antioxidants and Redox Signaling*, 14(11), pp. 2057-2070.
- Vainio, P. J., (2000). *Effects of Cotinine and Nicotine on Chromafin Cell Signalling*. Tesis. Helsinki: University of Helsinki.
- Valavanidis, A., Vlachogianni, T. y Fiotakis, K., (2009). Tobacco Smoke: Involvement of Reactive Oxygen Species and Stable Free Radicals in Mechanisms of Oxidative Damage, Carcinogenesis and Synergistic Effects with Other Respirable Particles. *Int J Environmental Research and Public Health*, 6(2), pp. 445-462.

- Velazquez-Ulloa, N. A., (2017). A Drosophil model developmental nicotine exposure. *PLOS One*, 12(5).
- Venereo-Gutiérrez, J. R., (2002). Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes. *Revista Cubana de Medicina Militar*, 31(2), pp. 126-155.
- Wetscher, G. J. *et al.*, (1995). Free radical production in nicotine treated pancreatic t . *Free Radical Biology and Medicine*, 18(5), pp. 877-882.
- Whittle, J. R. S. y Buratovich, M., (2001). Genetic Dissection of Wing Pattering in Drosophila. En: E. C. R. Reeve y I. Black, edits. *Encyclopedia of Genetics*. Chicago, EUA: Fitzroy Dearborn Publishers, p. 172.
- Wolpert, L. *et al.*, (2009). *Principios del Desarrollo*. 3a ed. Madrid, España: Ed. Médica Panamericana.
- Wright, S. C., Zhong, J., Zheng, H. y Larrick, J. W., (1993). Nicotine inhibition of apoptosis suggests a role in tumor promotion. *The FASEB Journal*, Volumen 7, pp. 1045-1051.
- Xia, E.-Q., Deng, G.-F., Guo, Y.-J. y Li, H.-B., (2010). Biological Activities of Polyphenols from Grapes. *International Journal Molecular Sciences*, 11, pp. 622-646.
- Xu, C., Li, C. Y. y Kong, A. N., (2005). Induction of phase I, II and III drug metabolism/transport by xenobiotics. *Archives of Pharmacal Research*, 3(28), pp. 249-268.
- Yamamoto, I. y Casida, J. E., (1999). *Nicotinoid Insecticides and the Nicotinic Acetylcholine Receptor*. Tokyo, Japan: Springer.
- Zheng, L.-F.*et al.*, (2006). DNA damage induced by resveratrol and its synthtic analogues in the presence of CU (II) ions: Mechanism and structure-activity relationship. *Free Radical Biology and Medicine*, 41, pp. 1807-1816.