

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**



---

---

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
IZTACALA**

**“EVALUACIÓN DEL EFECTO DEL RESVERATROL  
EN CO-TRATAMIENTO CON 4-NQO  
EN SMART EN ALA DE *Drosophila melanogaster*  
CRUZA ESTÁNDAR (CE).”**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

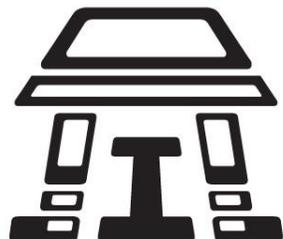
**B I Ó L O G A**

P R E S E N T A:

**CLARA SOFÍA PALACIOS LÓPEZ**

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

LOS REYES IZTACALA, EDO. DE MÉX. 2014





Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

"No hay inversión más rentable que la del conocimiento"

Benjamín Franklin

Dedicada a la persona más importante en mi vida, **mi mamá**. Por ser mi apoyo y enseñarme con su ejemplo que sí se quiere todo es posible, por creer en mí y darme las herramientas necesarias para llegar hasta donde estoy. Porque sin ella no sería lo que hoy soy.

## Agradecimientos

A la **Universidad Nacional Autónoma de México**, porque para mí es un orgullo ser parte de la máxima casa de estudios.

A la **Facultad de Estudios Superiores Iztacala**, por ser mi segunda casa, porque es aquí donde he vivido experiencias inolvidables y conocido personas increíbles que forman parte importante de mi vida.

A mi asesora, la **M. en C. Irma Dueñas** por abrirme las puertas del laboratorio, por confiar en mí y asesorarme a lo largo de este proceso. Gracias por darme los mejores consejos.

A mis sinodales la **Dra. Ana María García Bores** y el **Dr. Saúl Flores Maya** gracias por su tiempo y sugerencias que ayudaron a mejorar este proyecto. A los profesores, **Bíol. Luis Felipe Santos** y **M. en C. Ma. Eugenia Heres** gracias por todo lo que me han enseñado, por su paciencia, ayuda y consejos siempre acertados.

Al **M. en C. Ángel Durán** gracias por su ayuda en el análisis estadístico de este trabajo.

A una parte fundamental en mi vida, mi **papá**. Gracias por todos tus esfuerzos y brindarme tu confianza, por saber guiarme hasta donde estoy y darme la fuerza necesaria para seguir adelante. ¡Te amo!

A **Carla** gracias por apoyarme en mis decisiones, soportar mis cambios de humor y estar siempre para mí en los momentos difíciles, por ser mi cómplice, maestra y mejor amiga. ¡Te amo sista!

A mis familiares, **abuelos, tíos, primos** por apoyarme e interesarse en mí. Mi cariño y gratitud.

A **Eduardo**, gracias por haber formado parte de mi vida en un momento tan importante, por tu apoyo y por mostrarme que nunca es suficiente, que siempre podemos dar y hacer más. ¡Te quiero mucho y "Nos veremos en el futuro"!

A mis amigas **Mabel, Rocío y Diana** gracias por todos los años de amistad, por compartir tan bonitos y divertidos momentos, por apoyarme y animarme. Por seguir conmigo a pesar que el tiempo pase y las cosas cambien. ¡Las quiero!

A mi mejor amiga **Yury** gracias por todo! por las risas interminables, por estar a mi lado en los peores momentos y sobre todo por tener siempre las palabras correctas, aunque no siempre sean las que quiero escuchar. ¡Te quiero mucho!

A **Moe** gracias por escucharme y apoyarme siempre, por tus consejos y regaños, por ser una motivación para no temer a hacer cosas nuevas. ¡Amiga te quiero!

A **Rodolfo** gracias por tu amistad incondicional, por tu gran nobleza y por compartir conmigo momentos realmente importantes.

A **Aldo** gracias por estar conmigo a lo largo de la carrera y haber formado un buen equipo, por tu ayuda y porque a pesar de todo sigues demostrándome que puedo contar contigo. ¡Te quiero!

A mis compañeros de laboratorio, **Lalo, Jacky, Manuel, Lorena, Andy, Sandy, Miguel Ángel y Brenda** gracias por su ayuda y consejos. Porque sin ustedes, seguro no hubiera sido tan divertido.

## CONTENIDO

Índice de tablas .....	III
Índice de figuras .....	III
Índice de gráficas .....	IV
Lista de abreviaturas .....	VI
RESUMEN .....	1
INTRODUCCIÓN.....	2
Resveratrol .....	3
Metabolismo y biodisponibilidad del RES.....	6
Absorción, transporte, metabolismo y excreción del RES.....	8
Reacciones redox del RES .....	10
4-nitroquinolina 1-óxido (4-NQO).....	10
Estrés oxidativo y especies reactivas de oxígeno .....	12
ANTECEDENTES.....	14
Efecto modulador del RES al daño en el DNA.....	14
Efecto protector del RES .....	15
Efecto pro-oxidante del RES.....	16
Efecto genotóxico del RES.....	16
JUSTIFICACIÓN .....	18
HIPÓTESIS.....	18
OBJETIVOS.....	18
General.....	18
Particulares .....	18
MATERIALES Y MÉTODOS .....	19
Químicos .....	19
Biológicos .....	19
Cultivo y propagación de las cepas de <i>Drosophila melanogaster</i> .....	20
Cruza estándar (CE) y colecta de huevos .....	20

Diseño experimental .....	20
Diseción, montaje y revisión de alas .....	21
Análisis estadístico .....	22
RESULTADOS .....	24
Testigos disolventes .....	25
Resveratrol .....	27
4-NQO .....	28
4-NQO y co-tratamientos RES/4-NQO contra testigo negativo.....	30
Co-tratamientos RES/4-NQO contra testigo positivo .....	31
DISCUSIÓN .....	33
Testigos disolventes .....	33
Resveratrol .....	33
4-NQO .....	35
4-NQO y co-tratamientos RES/4-NQO contra testigo negativo.....	36
Co-tratamientos RES/4-NQO contra testigo positivo .....	36
CONCLUSIONES.....	39
REFERENCIAS.....	40
ANEXO I .....	54
Metabolismo xenobiótico .....	54
Reacciones de Fase I .....	54
Citocromos P450 .....	55
Reacciones de Fase II .....	55
ANEXO II .....	57
<i>Drosophila melanogaster</i> .....	57
Ciclo de vida de <i>Drosophila melanogaster</i> .....	58
Discos imaginales de <i>Drosophila melanogaster</i> .....	59
ANEXO III .....	60
Prueba de mutación y recombinación somática (SMART) en ala de <i>Drosophila melanogaster</i> .....	60

Pérdida de heterocigosis.....	62
-------------------------------	----

## Índice de tablas

<b>Tabla 1.</b> Principales fuentes de RES .....	3
<b>Tabla 2.</b> Efecto modulador del RES al daño en el DNA .....	14
<b>Tabla 3.</b> Efecto protector del RES .....	15
<b>Tabla 4.</b> Efecto pro-oxidante del RES .....	16
<b>Tabla 5.</b> Efecto genotóxico del RES .....	16
<b>Tabla 6.</b> Tratamientos crónicos (48 h) administrados a larvas de tercer estadio .....	21
<b>Tabla 7.</b> Resumen de resultados obtenidos de SMART en ala de <i>Drosophila melanogaster</i> cruza estándar (CE) .....	24
<b>Tabla 8.</b> Marcadores expresados en ala de <i>Drosophila melanogaster</i> .....	60

## Índice de figuras

<b>Figura 1.</b> Estructura química del <i>trans</i> -resveratrol y <i>cis</i> -resveratrol .....	5
<b>Figura 2.</b> Moléculas blanco del RES. Moléculas implicadas en la actividad anti-proliferativa, citotóxica, citostática y apoptótica del RES .....	6
<b>Figura 3.</b> Estructura química de los análogos y principales metabolitos del RES .....	8
<b>Figura 4.</b> Vías de absorción, transporte, metabolismo y excreción del RES .....	9
<b>Figura 5.</b> Mecanismo citotóxico del RES .....	10
<b>Figura 6.</b> Estructura del 4-NQO y sus metabolitos .....	12
<b>Figura 7.</b> Vías del metabolismo xenobiótico y sus efectos .....	56
<b>Figura 8.</b> Cromosomas de <i>Drosophila melanogaster</i> .....	57
<b>Figura 9.</b> Ciclo de vida de <i>Drosophila melanogaster</i> .....	58
<b>Figura 10.</b> Morfología, localización y estructuras del adulto a las que dan lugar los discos imaginales de <i>Drosophila melanogaster</i> .....	59
<b>Figura 11.</b> Diferentes tipos de clones y sus variaciones .....	61

**Figura 12 a.** Eventos genéticos que ocasionan la pérdida de heterocigosis de los marcadores *flr<sup>3</sup>* y *mwh* y su consiguiente expresión fenotípica ..... 63

**Figura 12 b.** Eventos genéticos que ocasionan la pérdida de heterocigosis de los marcadores *flr<sup>3</sup>* y *mwh* y su consiguiente expresión fenotípica ..... 64

## Índice de gráficas

**Gráfica 1.** Frecuencia de manchas pequeñas, grandes, gemelas y totales por individuo después de los tratamientos, EtOH 1%, Acetona 2% y Acetona 2%/EtOH 1% comparados contra el testigo Agua miliQ ..... 26

**Gráfica 2.** Distribución acumulada del tamaño de clones *mwh* por individuo después de los tratamientos EtOH 1%, Acetona 2% y Acetona 2%/EtOH 1% comparados contra el testigo Agua miliQ ..... 26

**Gráfica 3.** Frecuencia de manchas pequeñas, grandes, gemelas y totales por individuo después de los tratamientos RES (2.5, 10 y 40 µg/mL) comparados contra el testigo EtOH 1% ..... 27

**Gráfica 4.** Distribución acumulada del tamaño de clones *mwh* por individuo después de los tratamiento RES (2.5, 10 y 40 µg/mL) comparados contra el testigo EtOH 1% ..... 28

**Gráfica 5.** Frecuencia de manchas pequeñas, grandes, gemelas y totales por individuo después del tratamiento 4-NQO (2 mM) Acetona 2%/ EtOH 1%. comparado contra el testigo 4-NQO (2 mM) Acetona 2% ..... 29

**Gráfica 6.** Distribución acumulada del tamaño de clones *mwh* por individuo después del tratamiento 4-NQO (2 mM) Acetona 2%/EtOH 1% comparado contra el testigo 4-NQO (2 mM) Acetona 2% ..... 29

**Gráfica 7.** Frecuencia de manchas pequeñas, grandes, gemelas y totales por individuo después de los co-tratamientos con 4-NQO (2mM) Acetona 2%/ EtOH 1% y RES (2.5, 10 y 40 µg/mL) comparados contral el testigo Acetona 2%/ EtOH 1% ..... 30

**Gráfica 8.** Distribución acumulada del tamaño de clones *mwh* por individuo después de los co-tratamiento con 4-NQO Acetona 2%/EtOH 1% y RES (2.5, 10 y 40 µg/mL) comparado con el testigo Acetona 2%/EtOH 1% .....31

**Gráfica 9.** Frecuencia de manchas pequeñas, grandes, gemelas y totales por individuo después de los co-tratamiento con 4-NQO (2 mM) Acetona 2%/EtOH 1% y RES (2.5, 10 y 40 µg/mL) comparado con el testigo 4-NQO (2 mM) Acetona 2%/EtOH 1% .....32

**Gráfica 10.** Distribución acumulada del tamaño de clones *mwh* por individuo después de los co-tratamiento 4-NQO (2 mM) Acetona 2%/EtOH 1% y RES (2.5, 10 y 40 µg/mL) comparado con el testigo 4-NQO (2 mM) Acetona 2%/EtOH ..... 32

## Lista de abreviaturas

**Ac- 4HAQO:** 4-Acetoxiaminoquinolina 1-óxido.

**A549:** Células epiteliales alveolares humanas.

**Caco-2:** Células intestinales humanas.

**cDDP:** Cisplatino.

**CE:** Cruza estándar.

**CHO:** Células de ovario de hamster chino.

**CYP450:** Citocromo P450.

**EtOH:** Etanol.

***flr*<sup>3</sup>:** Marcador *flare*.

**GRX:** Células de murino.

**HL-60:** Línea celular promielítica de leucemia humana.

**HOCL:** Ácido hipocloroso.

**HR:** Humedad relativa.

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:** Peróxido de hidrógeno.

**K-S:** Prueba de Kolmogorov - Smirnov

**K562:** Línea celular de leucemia mielógena.

**MDA-MB-231:** Línea celular de adenocarcinoma de mama.

***mwh*:** Marcador *multiple wing hair*.

**NaAsO<sub>2</sub>:** Arsenito de sodio.

**•NO:** Radical de óxido nítrico.

**nm:** Nanómetros.

**•OH:** Radical hidroxilo.

**ONOO:** Peroxinitrito.

**•O<sub>2</sub>:** Radical superóxido.

**RES:** Resveratrol.

**•RO:** Radical alcoxilo.

**•ROO:** Radical peroxilo.

**ROS:** Especies reactivas de oxígeno.

**RNS:** Especies reactivas de nitrógeno.

**SMART:** Prueba de mutación y recombinación somática.

**STS:** Estilbeno sintetasas.

**URE:** Uretano.

**4-HAQO:** 4-Hidroxiaminoquinolina 1-óxido

**4-NQO:** 4-Nitroquinolina 1-óxido.

**8OHdG:** 8-hidroxidesoxiguanosina

## RESUMEN

Ya que el cáncer es una de las principales causas de muerte a nivel mundial debido, entre otros factores, a la exposición constante a xenobióticos, se ha recomendado el consumo de determinadas sustancias naturales con el objetivo de impedir o revertir el proceso de carcinogénesis. El resveratrol (RES) comúnmente encontrado en la piel de uvas rojas y vino tinto, es una fitoalexina producida por una gran variedad de especies de plantas en respuesta a situaciones estresantes, y reportado por sus propiedades quimiopreventivas, debidas a sus efectos apoptóticos, anti-proliferativos y anti-inflamatorios. Sin embargo, también se han descrito efectos pro-oxidantes por parte de este polifenol. En el presente trabajo, se evaluó el efecto del RES solo y en co-tratamiento con 4-NQO, un carcinógeno sintético, en la prueba SMART en ala de *Drosophila melanogaster*, craza estándar (CE). Hembras vírgenes de la cepa flare (*flr<sup>3</sup> / TM3, Bd<sup>S</sup>*) fueron cruzadas con machos de la cepa multiple wing hair (*mwh / mwh*), se realizaron tres experimentos independientes con tres repeticiones, donde larvas de tercer estadio (72±4 h) fueron alimentadas crónicamente con tratamientos de RES (2.5, 10 y 40 µg/mL) disuelto en EtOH 1%, agua Mili Q como testigo negativo, EtOH 1% y Acetona 2%/EtOH 1% como testigos disolventes y 4-NQO (2 mM) disuelto ya sea en Acetona 2% (4-NQO-Ac) o en Acetona 2%/EtOH 1% (4-NQO-Ac-OH) como testigos positivos. El tratamiento con RES 2.5 µg/mL aumentó significativamente la frecuencia de manchas grandes lo que indica un efecto genotóxico directo. Por otra parte al hacer la comparación entre los co-tratamientos RES (2.5, 10 y 40 µg/mL) con (4-NQO-Ac-OH) contra el testigo (4-NQO-Ac-OH), los co-tratamientos RES 10 y 40 µg/mL mostraron diferencias estadísticamente significativas en la frecuencia de manchas pequeñas, lo que indica un efecto genotóxico tardío por parte de éstos. Por lo que se concluye que el mecanismo de acción del RES depende de la concentración utilizada, además de que el RES no ejerció efecto protector contra el daño provocado por 4-NQO sino que lo incrementó.

Palabras clave: genotóxico, pro-oxidante, quimiopreención, xenobiótico.

## INTRODUCCIÓN

El cáncer es la primera causa de muerte en países económicamente desarrollados y segunda causa en países en desarrollo (Jemal *et al.*, 2011). Alrededor del mundo una de cada ocho muertes son debido a este padecimiento (Blecher *et al.*, 2011). En México es la tercera causa de muerte y cada año se suman más de 128 mil casos (Secretaría de Salud, 2013). Esta enfermedad se caracteriza por el crecimiento y propagación descontrolada de células anormales y se presenta después del daño permanente al DNA, provocado por factores genéticos y/o ambientales (Malcolm, 2001; Ferreira, 2006). Entre ellos la exposición a xenobióticos, que son compuestos químicos que no forman parte de la composición de los organismos vivos (Fetzner, 2013). Los xenobióticos son frecuentemente sustancias lipofílicas que entran fácilmente a las células; estos compuestos se hacen más hidrofílicos mediante un proceso llamado biotransformación, que involucra principalmente la oxidación, llevado a cabo por enzimas de la Fase I y conjugación con grupos polares por enzimas de la Fase II (Anexo I). Sin embargo, esta transformación puede conducir a la formación de radicales de oxígeno altamente reactivos y otras moléculas que interactúan fácilmente con el DNA, convirtiendo un compuesto pro-cancerígeno en cancerígeno (Signorelli y Ghidoni, 2005).

Uno de los xenobióticos más estudiados debido al daño que provoca al material genético es el 4-NQO, derivado de la quinolina que puede inducir aductos, rompimientos de una sola hebra, sitios abásicos, dímeros de pirimidina u oxidación de bases (Winkle y Tinoco, 1978).

Con el objetivo de prevenir el proceso de carcinogénesis se ha recomendado el consumo de determinados agentes químicos, naturales o sintéticos, empleados en la quimioprevención que han demostrado actividad antimutagénica, antiproliferativa y/o antioxidante en mayor o menor medida (Martínez, 2000).

Los antioxidantes se encuentran ampliamente distribuidos de manera natural en las plantas, siendo los polifenoles los más abundantes en nuestra dieta. Estos polifenoles pueden proteger a las células contra daño oxidativo, por lo tanto, disminuir el riesgo de varias enfermedades degenerativas asociadas con estrés oxidativo causado por la

sobreproducción de especies reactivas de oxígeno (ROS), entre éstas, el cáncer (D'Archivio *et al.*, 2007; Tsao, 2010). Sin embargo, también se han descrito efectos pro-oxidantes de estos compuestos polifenólicos, produciendo alteraciones en los procesos fisiológicos de las células (Elbling *et al.*, 2005; D'Archivio *et al.*, 2007).

Actualmente existe mucho interés en el resveratrol (RES) ya que, como compuesto polifenólico, parece tener efectos benéficos para la salud (Frémont, 2000).

## Resveratrol

El resveratrol (RES) es una fitoalexina presente en una amplia variedad de especies de plantas, donde su síntesis es inducida por factores externos de estrés (radiación ultravioleta, infecciones fúngicas, lesiones, etc.) (Asensi *et al.*, 2002). Este polifenol es consumido comúnmente en la dieta humana, se encuentra abundantemente en las uvas (*Vitaceae ssp*) y vino tinto, también está presente en los arándanos (*Vaccinium spp.*), grosellas (*Vaccinum spp.*), las moras (*Morus spp.*) y los cacahuates (*Arachis hypogaea*) (Tabla 1) (Suenaga *et al.*, 2008; Soleas *et al.*, 1997; Sato *et al.*, 2000).

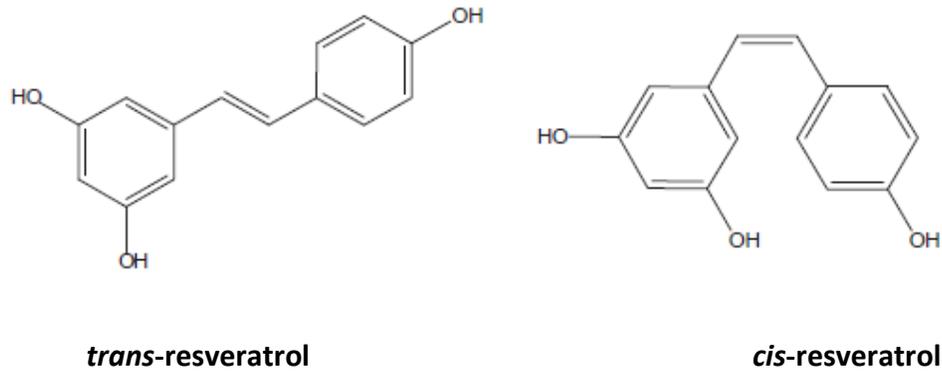
**Tabla 1.** Principales fuentes de RES (Modificado Baur y Sinclair 2006).

Fuente	Concentración <i>trans</i> -resveratrol	Presencia de otros polifenoles
Vino tinto	0.1-14.3 mg/L	<i>cis</i> -resveratrol, <i>trans</i> -piceído y <i>cis</i> -piceído por lo general a concentraciones más bajas.
Vino blanco	<0.1-2.1 mg/L	<i>trans</i> -piceído y <i>cis</i> -piceído
Jerez	Generalmente <0.1 mg/L	
Uvas	0.16–3.54 µg/g	<i>trans</i> -piceído es predominante en concentraciones de 1.5-7.3 mg/g.

<b>Piel de uvas secas</b>	24.06 µg/g (media)	<i>trans</i> -piceído y <i>cis</i> -piceído a concentraciones de 42.19 µg/g y 92.33 µg/g respectivamente.
<b>Jugo de uva roja</b>	0.50 mg/L (media)	<i>trans</i> -piceído, <i>cis</i> -piceído y <i>cis</i> -resveratrol a concentraciones de 3.38 mg/L, 0.79 mg/L y 0.06 mg/L respectivamente
<b>Jugo de arándano</b>	~ 0-2 mg/L	<i>Cis</i> -resveratrol a concentraciones de ~ 0.03 mg/L
<b>Arándanos</b>	Hasta ~ 32 ng/g	
<b>Cacahuates</b>	0.02-1.92 µg/g	
<b>Pistaches</b>	0.09–1.67 µg/g	

La estructura del RES consiste en dos anillos fenólicos unidos por un doble enlace que forman el 3, 5,4'-trihidroxiestilbeno, este doble enlace es el responsable de las formas isoméricas *cis* y *trans* del RES (Figura 1) (Trela y Waterhouse, 1996).

La forma más abundante es el *trans*-resveratrol. El *cis*-resveratrol no se encuentra disponible comercialmente, sin embargo el isómero *trans* puede ser convertido a *cis* si se expone a la luz solar o artificial debido a que el RES es un compuesto extremadamente fotosensible (Amri *et al.*, 2012; Gambini *et al.*, 2013). Ambos isómeros pueden tener efectos biológicos distintos (Gambini *et al.*, 2013).

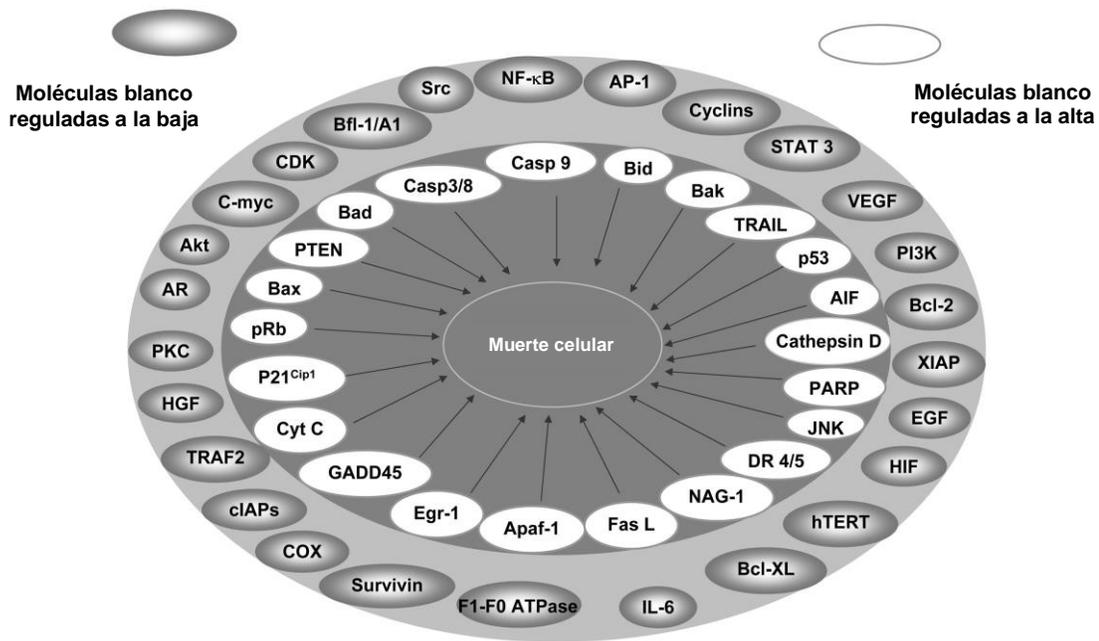


**Figura 1.** Estructura química del *trans*-resveratrol y *cis*-resveratrol (Tomado de Gambini *et al.*, 2013).

El RES fue aislado por primera vez de la raíz de *Polygonum cuspidatum*, planta utilizada en la medicina tradicional Oriental como un agente antiinflamatorio (Amri *et al.*, 2012).

El RES tiene extensas propiedades biológicas, incluyendo actividad antioxidante y antiproliferativas, así como protección cardiovascular. Por lo tanto, el RES exhibe numerosos mecanismos de acción diferentes y puede actuar sobre un gran número de moléculas blanco (Figura 2) (Suenaga *et al.*, 2008; Shakibaei *et al.*, 2009).

Las propiedades benéficas del RES son atribuidas a su habilidad de eliminar radicales libres, lo que disminuye el estrés oxidativo inducido por químicos carcinógenos y suprime la lipoperoxidación. Incluso, se ha demostrado que inhibe la activación transcripcional de algunos citocromos P450, enzimas que participan en el metabolismo de xenobióticos e inducen enzimas de Fase II (Cadenas y Barja, 1999; Bhat y Pezzuto, 2002; Belguendouz *et al.*, 1997). Además inhibe la proliferación celular, induce apoptosis y bloquea la progresión del ciclo celular en diversos tipos de líneas celulares (Walle *et al.*, 2004).



**Figura 2.** Moléculas blanco del RES. Moléculas implicadas en la actividad anti-proliferativa, citotóxica, citostática y apoptótica del RES (Modificado de Shakibaei *et al.*, 2009).

## Metabolismo y biodisponibilidad del RES

El grado de absorción del RES puede ser evaluado por las concentraciones presentes en plasma, del total de RES consumido vía oral; su ingestión en humanos conduce a una concentración 2  $\mu\text{M}$  y una vida media de 6.5 a 14.9 h (Delmas *et al.*, 2006).

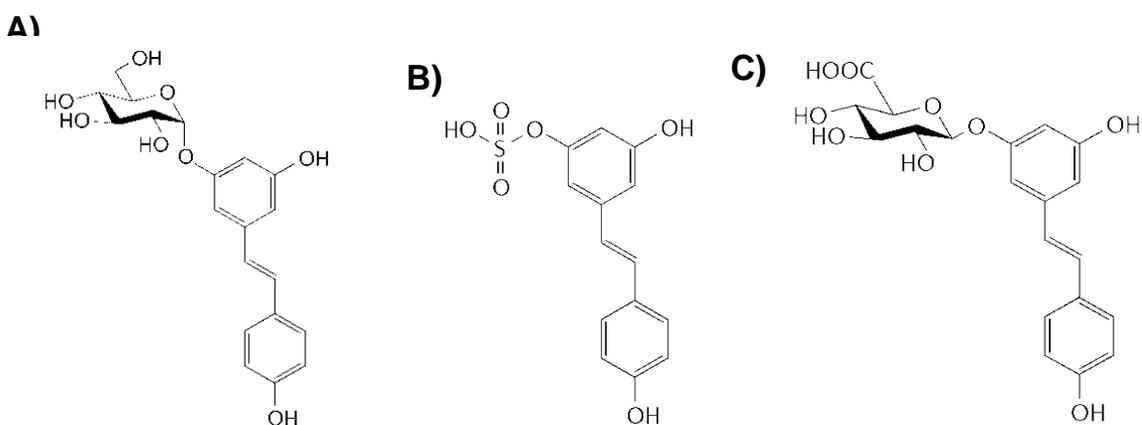
El RES posee un metabolismo que conduce a la producción de sulfatos, glucurónidos, y hasta cinco metabolitos distintos presentes en la orina: monosulfato de resveratrol, dos formas isoméricas de monoglucurónido de resveratrol, dihidroresveratrol monosulfato y dihidroresveratrol monoglucurónido, presentando el procesos de conjugación en los grupos hidroxilo (Walle *et al.*, 2004; Cottart *et al.*, 2010; Walle 2011). Los sitios de glucuronidación en la molécula del RES se han establecido en las posiciones 3 y 4'. De la misma manera el principal sitio de sulfatación es en la posición 4' (Learmonth, 2003; Walle, 2011). Mientras que la glucuronidación fue considerada la principal vía de conjugación, estudios recientes aseguran que la sulfatación es más importante en humanos (Walle *et al.*, 2004; Boocock *et al.*, 2007).

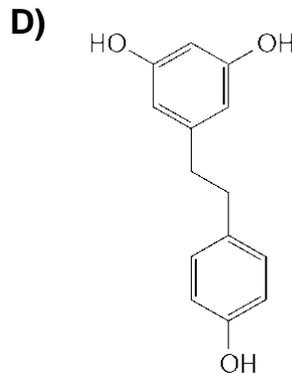
La cuantificación del RES libre en plasma de humanos fue descrito por primera vez por Soleas y colaboradores en 2001. Sin embargo, recientemente se han medido indirectamente el total de metabolitos conjugados del RES, donde se determinó glucurónidos y sulfatos en humanos mediante tratamientos enzimáticos con glucuronidasa o arilsulfatasa (Cottart *et al.*, 2010).

Boocock y colaboradores (2007) identificaron dos monosulfatos conjugados, un disulfato, dos mono glucurónidos y un glucurónido-sulfato en humanos después de la ingesta oral de 1 g de RES.

En muestras de orina colectadas de cinco voluntarios después del consumo de vino los principales metabolitos detectados fueron *cis*-resveratrol-4'-sulfato, *cis*-resveratrol-3-O-glucurónido y *cis*-resveratrol-4'-O-glucurónido (Urpi *et al.*, 2007). Sin embargo, no hay información que indique si estos metabolitos son el resultado del metabolismo del *cis*-resveratrol o de la isomerización del *trans*-sulfato o de glucurónidos conjugados (Cottart *et al.*, 2010).

Una vez en el torrente sanguíneo, los metabolitos pueden ser sometidos a la fase II del metabolismo con las conversiones que se producen en el hígado (Crozier *et al.*, 2009).





**Figura 3.** Estructura química de los análogos y principales metabolitos del RES. **A)** Resveratrol-3-O- $\beta$ -D-glucósido (piceído), **B)** Resveratrol-3-sulfato, **C)** Resveratrol-3-O-glucurónido y **D)** Dihidroresveratrol (Modificado de Baur y Sinclair, 2006).

### **Absorción, transporte, metabolismo y excreción del RES**

La absorción y transporte del RES ha sido estudiado en gran cantidad de modelos (Figura 5). Experimentos con intestino de rata perfundido *in vitro* muestran que el yeyuno y en menor medida el íleon están implicados en la absorción de éste (Kuhnle *et al.*, 2000).

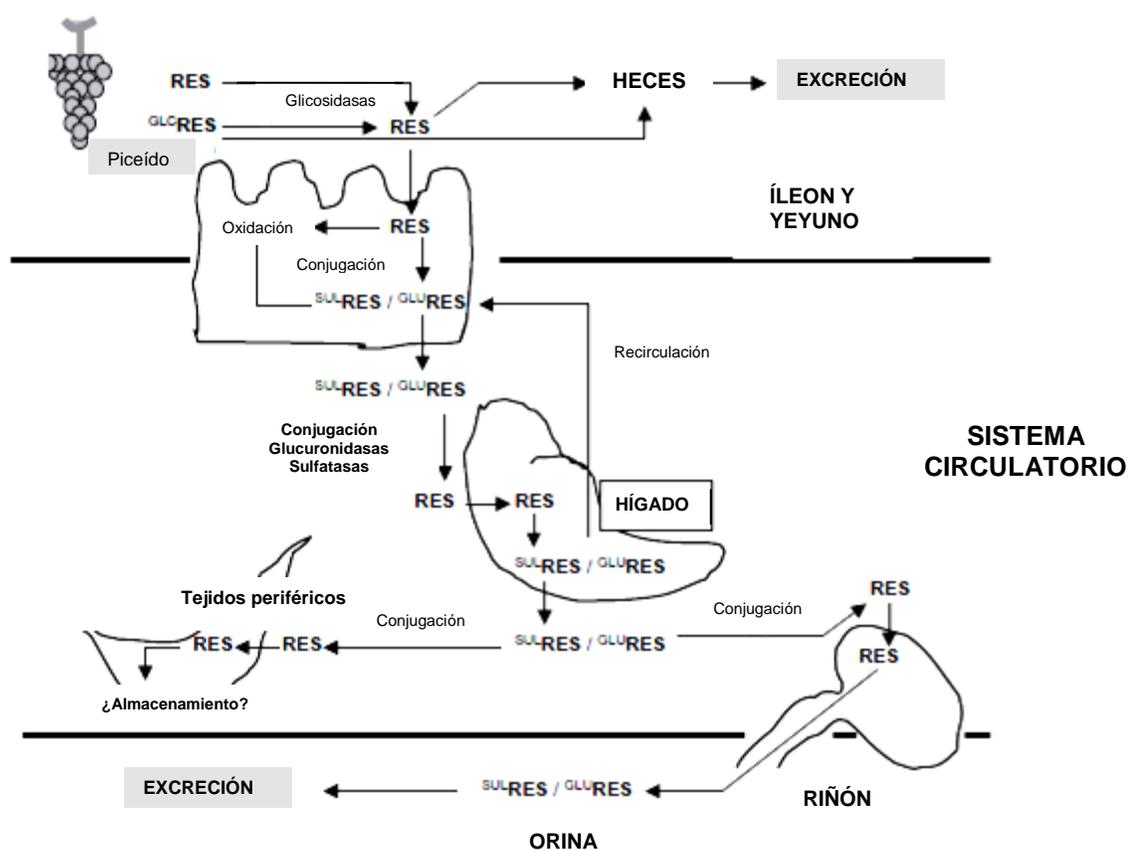
La mayor parte del RES es metabolizado principalmente como glucurónido y también como sulfatos conjugados. La cantidad total de RES y los conjugados que cruzan el epitelio intestinal es sólo 6% del total del RES perfundido (Kuhnle *et al.*, 2000). Mientras que en estudios *in vivo*, por ejemplo, en ratones alimentados con RES por vía oral se ha demostrado que hasta el 75% del contenido ingerido es absorbido y el resto es eliminado en las heces (Soleas *et al.*, 2001).

Estudios *in vitro* muestran que el RES es metabolizado por células intestinales y se libera de los enterocitos de manera conjugada. En células intestinales humanas (Caco-2) fue liberado principalmente como conjugado sulfatado y sólo una mínima cantidad como glucurónido conjugado. Mientras que en ratas la mayoría del metabolismo del RES, implica la glucuronidación (Kaldas *et al.*, 2010; Kuhnle *et al.*, 2000; Soleas *et al.*, 2001).

La conversión del RES en conjugados hidrofílicos puede facilitar su entrada en el terrente sanguíneo, su difusión por todo el cuerpo, y lo más importante su excreción (Signorelli y Ghidoni, 2005). Estudios *in vivo* muestran que después de la administración oral del RES,

formas conjugadas de éste aparecen en plasma. El hígado y la vesícula biliar filtran el RES y sus metabolitos procedentes de la circulación donde son transportados al intestino a través de la bilis (Bertelli *et al.*, 1998; Marier *et al.*, 2002).

En modelos animales se ha mostrado que la excreción renal del RES comienza en cuestión de horas después de la ingesta y aumenta a lo largo de las próximas 12 a 24 h. En el riñón el RES está presente principalmente en su forma natural, mientras que en la orina, la mayoría de los compuestos presentes están en su forma conjugada (Vitraca *et al.*, 2003).



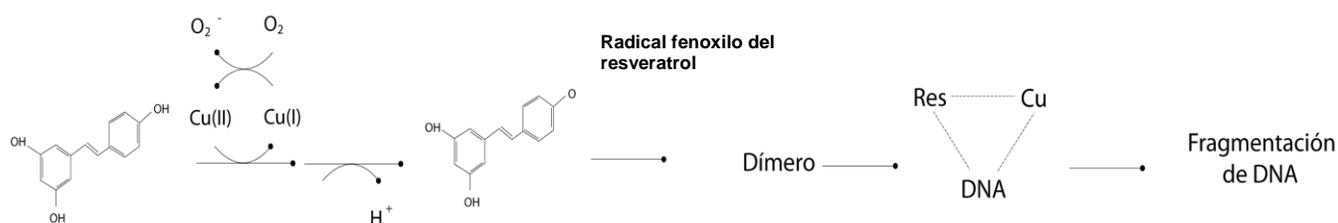
**Figura 4.** Vías de absorción, transporte, metabolismo y excreción del RES. <sup>GLC</sup>RES; resveratrol-3-O-β-glucosido (piceído), <sup>SUL</sup>RES; resveratrol-3-sulfato, <sup>GLU</sup>RES, resveratrol-3-O-β-glucurónido. (Modificado de Signorelli y Ghidoni, 2005).

## Reacciones redox del RES

Como otros polifenoles, el RES puede sufrir un proceso de auto-oxidación lo que implica la producción de  $O_2^-$  y  $H_2O_2$  y una mezcla de semiquinonas y quinonas que pueden llegar a ser citotóxicas (Sang *et al.*, 2007).

Estos eventos de auto-oxidación o degradación son muy importantes, ya que el RES oxidado podría generar complejos con otras moléculas como iones de cobre. Aproximadamente 20% de cobre se encuentra en el núcleo de las células y está estrechamente asociado con las bases de DNA en particular con guanina (Hadi *et al.*, 2010; Agarwal, 1989).

El mecanismo citotóxico del RES, probablemente involucra la movilización de iones de cobre. En primer lugar, el RES se somete a oxidación en presencia de Cu (II), de hecho el producto oxidativo del RES es un dímero, y la transferencia inicial de electrones genera la reducción de Cu (II) a Cu (I) (Figura 6). Además de que la molécula de RES oxidada puede generar complejos con el cobre, los cuales son capaces de fragmentar al DNA (Hadi *et al.*, 2010).



**Figura 5.** Mecanismo citotóxico del RES (Modificado de Alarcón de la Lastra y Villegas, 2007).

## 4-nitroquinolina 1-óxido (4-NQO)

El 4-NQO es un carcinógeno sintético derivado de la quinolina, soluble en agua, sensible a la luz y a altas temperaturas. Es usado para estudiar las diversas etapas de carcinogénesis oral, ya que es capaz de inducir secuencialmente las fases de ésta (Wilkey *et al.*, 2009).

El 4-NQO se comporta de manera similar a la radiación ionizante, provocando ruptura de cadena sencilla de DNA y a la luz ultravioleta, debido a las lesiones que provocan y a sus diversos sistemas de reparación, a menudo ha sido referido como agente mimético de la luz UV (Kondo y Kato, 1968; Ikenaga *et al.*, 1975a). Los aductos inducidos por 4-NQO y los dímeros de pirimidina inducidos por rayos UV, son reparados de la misma manera, por escisión de nucleótidos (Sanear y Sanear, 1988).

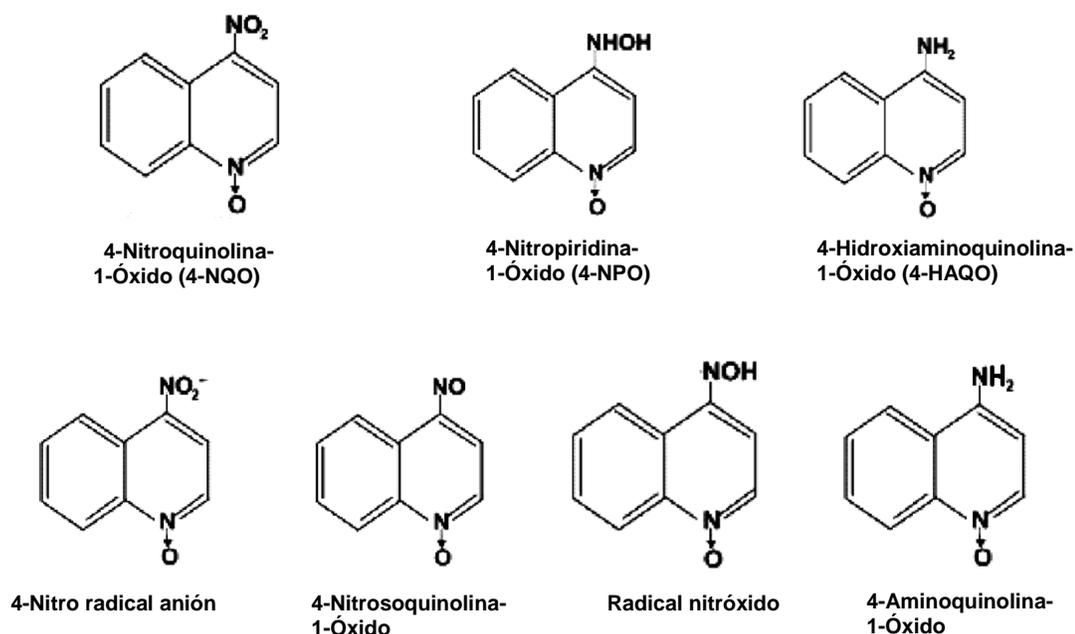
La acción de este químico carcinógeno es iniciada por la reducción enzimática de su grupo nitro (Figura 7) (Nagao y Sugimura, 1976; Kitano, 2000). La reducción del cuarto electrón resulta en 4-hidroxiaminoquinolina 1-óxido (4-HAQO), el cual puede ser el metabolito carcinógeno más próximo del 4-NQO y está implicado en la formación de aductos en el DNA y de 8-hidroxidesoxiguanosina (8-OHdG), el cual es el responsable del daño oxidativo (Tada y Tada, 1975; Kohda *et al.*, 1991; Arima *et al.*, 2006). Se ha sugerido que el 4-HAQO *in vitro* es capaz de generar ROS, como radical superóxido ( $\bullet\text{O}_2$ ) y el peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2\bullet$ ) (Ishizawa y Endo, 1967; Sugimura *et al.*, 1968; Hozumi, 1969).

Cuando el 4-NQO es metabolizado a 4-acetoxiaminoquinolina 1-óxido (Ac-4HAQO), agregándole un grupo acilo, puede unirse al DNA produciendo monoadductos quinolina-purina en las posiciones N-2 (3-(deoxiguanosin- $\text{N}^2$ -yl)-4-aminopurina 1-óxido) C-8 (N-(deoxiguanosin- $\text{C}^8$ -yl)-4-aminoquinolina 1-óxido) de guanina y N-6 (3-(deoxiadenosin- $\text{N}^6$ -yl)-4-aminoquinolina 1-óxido) de adenina (Nagao y Sugimura, 1976; Galiègue-Zouitina *et al.*, 1985).

El mecanismo de acción del 4-NQO es a través de la generación de ROS y de especies reactivas de nitrógeno (RNS) tales como radicales superóxido, peróxido de hidrógeno y óxido nítrico, los que inducen estrés oxidativo intracelular (Nunoshiba y Demple, 1993). ROS/RNS dañan directa e indirectamente a las macromoléculas, incluyendo el DNA, predominantemente con la unión entre los residuos de guanina, lo que produce aductos (Kanojia y Vaidya, 2006).

Se ha demostrado que el 4-NQO induce apoptosis a través de vías de señalización mitocondrial dependientes de p53 resultante del daño al DNA (Han *et al.*, 2007). P53 es un

factor supresor de tumores activado en respuesta a estrés celular para mediar la apoptosis (Burns y El-deriry, 1999).



**Figura 6.** Estructura del 4-NQO y sus metabolitos (Modificado de Nunoshiba y Demple, 1993).

## Estrés oxidativo y especies reactivas de oxígeno

El estrés oxidativo es conocido por estar relacionado con la patogénesis de enfermedades relacionadas con el estilo de vida, incluyendo hipertensión, diabetes *mellitus*, enfermedades isquémicas y tumores malignos; es perjudicial ya que existe una excesiva producción de radicales libres, que son átomos, moléculas o compuestos altamente inestables, frecuentemente referidos como ROS y RNS los cuales atacan a las moléculas biológicas: lípidos, proteínas y DNA (Yoshikawa y Naito, 2002; Valko *et al.*, 2006).

La generación intracelular de ROS comprende principalmente al radical superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ) y al radical de óxido nítrico ( $NO^{\bullet}$ ) que se incrementan durante la exposición a

contaminantes, luz UV y radiación ionizante (Figura 8)(Winterbourn, 2008; Kunwar y Priyadarsini, 2011).

Los radicales  $\text{NO}^\bullet$  y  $\text{O}_2^{\bullet-}$  son convertidos a radicales oxidantes como radicales hidroxilo ( $^\bullet\text{OH}$ ), radicales alcoxi ( $\text{RO}^\bullet$ ), radicales peroxilo ( $\text{ROO}^\bullet$ ) y oxígeno singlete ( $^1\text{O}_2$ ) mediante reacciones de transformación. Algunos radicales son convertidos a oxidantes moleculares como peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ) y ácido hipocloroso ( $\text{HOCl}$ ) (Kunwar y Priyadarsini, 2011).

Bajas concentraciones de ROS son esenciales para las funciones fisiológicas, tales como expresión génica, crecimiento celular y defensa contra infecciones (Droge, 2002). Sin embargo, a altas concentraciones las membranas celulares son vulnerables a la oxidación por ROS debido a la presencia de ácidos grasos insaturados en sus componentes lipídicos, causando lipoperoxidación, lo que provoca el entrecruzamiento de las proteínas y el cambio en la fluidez de la membrana y la formación de aductos, que son perjudiciales para el funcionamiento de la célula (Beckman y Ames, 1997).

Las proteínas pueden sufrir daños directos o indirectos tras la interacción con ROS, resultando en cambios en su estructura terciaria, degradación proteolítica y fragmentación. Los productos de la oxidación de proteínas son carbonilos como aldehídos y cetonas (Beckman y Ames, 1997; Kunwar y Priyadarsini, 2011).

Aunque el DNA es estable, la interacción con ROS puede provocar la modificación de las bases de polinucleótidos, la ruptura de las cadenas sencilla y doble, depurinación, daño en la desoxirribosa y en los sistemas de reparación del DNA (Beckman y Ames, 1997).

La consecuencia del daño al DNA es la modificación del material genético, resultando en muerte celular, mutagénesis o carcinogénesis (Kunwar y Priyadarsini, 2011).

## ANTECEDENTES

Recientemente se han referido en la literatura científica al RES por sus propiedades anti-inflamatorias, anti-oxidantes y anti-proliferativas (Tablas 2 y 3), sin embargo, también se han reportado efectos citotóxicos y pro-oxidantes de este compuesto, dependiendo de las concentraciones utilizadas (Tablas 2, 4 y 5).

**Tabla 2. Efecto modulador del RES al daño en el DNA**

Autor y año	Ensayo	Resultados
De Salvia <i>et al.</i> , 2002.	Ensayo cometa y aberraciones cromosómicas en células de ovario de hámster chino (CHO).	El RES “per se” no induce daño al DNA.
		El co-tratamiento RES/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> a concentraciones de 11 y 22 µg/mL no aumentó el daño inducido por H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .
		La administración de RES (11 y 22 µg/mL) en pre-tratamiento parece reducir el daño inducido por H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .
		Pre-tratamiento con RES a la concentración más alta (44 µg/mL) incrementó el porcentaje de aberraciones cromosómicas.
Chan y Chang, 2006.	Ensayo de ROS en células K562.	El RES a concentraciones de 100 y 200 µM incrementó el estrés oxidativo inducido por altas concentraciones de etanol (250-400 mM).
		Concentraciones de RES de 10 y 25 µM inhibieron la apoptosis inducida por el etanol.

Mitrut <i>et al.</i> , 2009.	Ensayo de micronúcleos en cultivo de células de adenocarcinoma gástrico.	El RES indujo micronúcleos de manera dosis-dependiente (10 y 20 µg/mL) en células expuestas durante 72 h.
		El RES disminuyó la frecuencia de micronúcleos a concentraciones de 5 µg/mL expuestas durante 48 h.
Chen <i>et al.</i> , 2013.	Ensayo cometa y ensayo de micronúcleos en células de adenocarcinoma epitelial de pulmón humano (A549).	Concentraciones de 1 y 5µM ejercieron efectos benéficos, disminuyendo el daño al DNA y el nivel de estrés oxidativo, promoviendo la viabilidad y proliferación en células de adenocarcinoma epitelial de pulmón humano expuestas a NaAsO <sub>2</sub> .
		El RES a concentración de 20 µM inhibió la supervivencia de células de adenocarcinoma epitelial de pulmón humano expuestas a NaAsO <sub>2</sub> .

**Tabla 3. Efecto protector del RES**

Autor y año	Ensayo	Resultados
Attia, 2012.	Ensayo cometa y ensayo de micronúcleos en células de somáticas y germinales de ratón.	Pre-tratamiento con RES (50 y 100 mg/kg) en células de ratón, redujo significativamente la genotoxicidad y apoptosis inducida por cisplatino (cDDP). Asegurando que el efecto protector por parte del RES es más efectivo a altas dosis.

**Tabla 4. Efecto pro-oxidante del RES**

Autor y año	Ensayo	Resultados
Zheng <i>et al.</i> , 2006.	Determinación de daño oxidativo al DNA en la línea celular HL-60.	RES (44 µg/mL) en presencia de Cu(II) indujo daño al DNA.
Meira <i>et al.</i> , 2013.	Análisis de estrés oxidativo en células hepáticas.	Tratamientos con RES incrementaron la producción de especies reactivas de oxígeno en células de murino (GRX) expuestas a 24 y 120 h de tratamiento, de manera dosis-dependiente (0.1, 1, 10 y 50 µM) (0.022, 0.22, 2.28 y 11.4 µg/mL). Además el tratamiento con la dosis más alta de RES redujo la cantidad de células vivas.

**Tabla 5. Efecto genotóxico del RES**

Autor y año	Ensayo	Resultados
Matsuoka <i>et al.</i> , 2001.	Ensayo de aberraciones cromosómicas, ensayo de micronúcleos y ensayo de intercambio de cromátides hermanas en células de pulmón de hámster chino.	El RES produjo aberraciones cromosómicas estructurales y aneuploidias a concentraciones de 2.5-20 µg/mL. Indujo células micronucleadas y polinucleadas bajo las mismas concentraciones en células expuestas a 48 h de tratamiento.
		El RES provocó un retraso en el ciclo celular a la concentración de 10 µg/mL.
		El RES indujo intercambio de cromátides hermanas de manera dosis-dependiente a las concentraciones de 2.5, 5 y 10 µg/mL.

Schmitt <i>et al.</i> , 2002.	Ensayo de micronúcleos en células de linfoma de ratón, en células de hámster chino y en células de adenocarcinoma de mama (MDA-MB-231).	El RES indujo micronúcleos, desplazamiento de cromosomas metafásicos y toxicidad en células de linfoma de ratón.
		Inducción de micronúcleos en células de hámster Chino.
		Inhibición en crecimiento de células MDA-MB-231.
Ahmad <i>et al.</i> , 2005.	Análisis de daño al DNA inducido por RES-Cu (II) en plásmidos.	En plásmidos tratados con RES o RES/Cu (II) se incrementó el porcentaje de mutaciones por deleción.
		La frecuencia de mutaciones aumentó en plásmidos tratados con RES y Cu (II) simultáneamente, de manera dosis-dependiente (2.28-45.6 µg/mL).
Gómez, 2013.	SMART en ala de <i>Drosophila melanogaster</i> , craza estándar.	El RES presentó efectos genotóxicos a las concentraciones 2.5, 10 y 20 µg/mL sin relación concentración-respuesta, siendo la menor concentración la que mostró mayor efecto.
Silva, 2013.	SMART en ala de <i>Drosophila melanogaster</i> , craza estándar.	El RES mostró ser genotóxico y capaz de modular la genotoxicidad del URE.

## JUSTIFICACIÓN

Debido a que se ha propuesto que el consumo de productos naturales reduce el riesgo de carcinogénesis, en los últimos años se le ha atribuido al RES gran cantidad de beneficios para la salud, tales como propiedades antioxidantes y quimiopreventivas. Varias empresas farmacéuticas han lanzado al mercado diferentes presentaciones de este producto incrementando su consumo, es por esto, el interés de evaluar los efectos biológicos de este posible quimioprotector contra los efectos de un agente cancerígeno.

## HIPÓTESIS

En función de las referencias que reportan los efectos benéficos del RES, se esperaría encontrar disminución del daño provocado por 4-NQO gracias al efecto antioxidante y/o antimutagénico del RES en el ensayo SMART.

## OBJETIVOS

### General

- ✦ Evaluar el efecto protector del RES en co-tratamiento con un agente mutagénico y cancerígeno en la prueba de ala de *Drosophila melanogaster* (cruza estándar, CE).

### Particulares

- ✦ Determinar el efecto del RES a diferentes concentraciones (2.5, 10 y 40 µg/mL).
- ✦ Comparar el daño provocado por 4-NQO disuelto en acetona 2% contra el 4- NQO disuelto en acetona 2% / EtOH 1%.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Químicos

- ✦ **Resveratrol (RES)**.  $C_{14}H_{12}O_3$ . Aislado de *Yucca periculosa* (Baker) y donado por la Dra. Ana María García Bores del Laboratorio de Fitoquímica, de la Unidad de Biotecnología y Prototipos (UBIPRO) de la FES Iztacala, UNAM.
- ✦ **4-Nitroquinolina 1-óxido (4-NQO)**.  $C_9H_6N_2O_3$ . CAS 56-57-5, pureza 97%. Sigma- Aldrich (Saint Louis, MO, EE.UU).
- ✦ **Etanol**.  $C_2H_6O$ . CAS 64-17-5, pureza 99%. ©Merck KGaA (Darmstadt, Alemania).
- ✦ **Acetona**.  $C_3H_6O$ . CAS No. 67-64-1, pureza 99.9%. Sigma- Aldrich (Saint Louis, MO, EE.UU.).
- ✦ **Entellan**. CAS 1.07961. ©Merck KGaA (Darmstadt, Alemania).
- ✦ **Solución conservadora**. (5 mL de Tegosept 12% (EtOH), 5 mL de ácido propiónico: ácido ortofosfórico (1:10) aforados a 1 L de agua) (Dueñas *et al*, 2002).

### Biológicos

- ✦ **Cepas de *Drosophila melanogaster***. (Anexo II) Donadas originalmente por el Dr. Ulrich Graf del Instituto de Toxicología (Swiss Federal Institute of Technology) y de la Universidad de Zurich, Schwerzenbach, Suiza y mantenidas en el Laboratorio de Genética Toxicológica de la FES Iztacala, UNAM.
  - ✦ flare<sup>3</sup> (*flr<sup>3</sup>/TM3, Bd<sup>s</sup>*)
  - ✦ multiple wing hair (*mwh/mwh*)
- ✦ **Medio instantáneo *Drosophila* (DIM, por sus siglas en inglés)**. Se obtuvo de *Carolina Biological Supply Co* (Burlington, North Carolina, EUA).
- ✦ **Hojuelas de papa deshidratada Maggie®**. Medio de cultivo estándar.
- ✦ **Levadura fresca activada**. La Florida®, sacarosa y agua para colecta de huevos.

## **Cultivo y propagación de las cepas de *Drosophila melanogaster***

Las cepas flare<sup>3</sup> y multiple wing hair se mantuvieron y propagaron a una temperatura de 25° C y 65 % de humedad relativa (HR), en frascos de vidrio de 250 mL previamente esterilizados conteniendo 5 g de hojuela de papa hidratada con 20 mL de solución conservadora, la cual sirve como bactericida y fungistático (Dueñas *et al.*, 2002).

## **Cruza estándar (CE) y colecta de huevos**

El aislamiento de 200 hembras vírgenes de la cepa flare<sup>3</sup> y 100 machos de la cepa multiple wing hair, se llevó a cabo. En seguida se colocaron en frascos de vidrio con medio de hojuela de papa y solución conservadora a una temperatura de 25° C y 65% de HR para la realización de la craza estándar. Posteriormente, las moscas fueron trasvasadas a frascos de vidrio con levadura fresca durante 8 h, a total obscuridad, 25° C y 65% de HR, estas condiciones son necesarias ya que la expresión del marcador *mwh* se ve afectado por cambios constantes de temperatura y una alta humedad permite la producción de un gran número de huevos, además de evitar la desecación del medio (Graf, 1986; Graf y Singer, 1992). Tres días después, se recuperaron larvas de tercer estadio ( $72 \pm 4$  h de edad) diluyendo la levadura con agua corriente a 25° C y haciéndola pasar por una coladera de acero inoxidable de malla fina.

## **Diseño experimental**

Tres experimentos independientes con tres réplicas cada uno se realizaron, donde se agregaron las larvas recuperadas en tubos de ensayo con 0.5 g de DIM hidratado con 2 mL de las diferentes soluciones. Los tratamientos evaluados se muestran en la Tabla 6.

**Tabla 6.** Tratamientos crónicos (48 h) administrados a larvas de tercer estadio. Siendo 10 µg/mL de RES la concentración encontrada en plasma humano (Cottart *et al.*, 2010), por lo que se decidió utilizar una concentración mayor (40 µg/mL) y una menor 2.5 µg/mL).

Testigo Negativo	Testigos Disolventes	Testigos Positivos	Testigos RES	Co-tratamientos
Agua miliQ	EtOH 1%	4NQO (2.0 mM) Acetona 2%	RES 2.5 µg/mL EtOH 1%	RES 2.5 µg/mL + 4NQO (2.0 mM) Acetona 2%/EtOH 1%
	Acetona 2%	4NQO (2.0 mM) Acetona 2%/EtOH 1%	RES 10 µg/mL EtOH 1%	RES 10 µg/mL + 4NQO (2.0 mM) Acetona 2%/EtOH 1%
	Acetona 2%/ EtOH 1%		RES 40 µg/mL EtOH 1%	RES 40 µg/mL + 4NQO (2.0 mM) Acetona 2%/EtOH 1%

Los tubos con los diferentes tratamientos se incubaron a 25°C hasta que emergieron los adultos. Éstos se colectaron y almacenaron en frascos con EtOH al 70%.

### Disección, montaje y revisión de alas

Posteriormente se recuperaron los imagos, se separaron aquellos que presentaban alas con fenotipo silvestre (genotipo *mwh* + / + *flr*<sup>3</sup>), cuidando la proporción 1:1 entre machos y hembras, a los que se les desprendieron las alas para realizar preparaciones permanentes con Entellan®, dejándolas secar durante 24 h.

Las alas se revisaron a 40x bajo estricto control, registrando la frecuencia y tipo de clones (pequeñas, grandes y gemelas) para los marcadores *mwh* y *flr*<sup>3</sup> (Graf *et al.*, 1984). Para la lectura de las laminillas, a cada tratamiento se le asignó una clave para evitar el prejuicio en la revisión.

## Análisis estadístico

Un mínimo de 55 individuos por tratamiento se revisó, ya que según Frei y Würgler (1995) éste es el tamaño óptimo de la muestra para obtener resultados estadísticamente significativos.

Los resultados obtenidos se analizaron utilizando el programa SMART para PC (Frei y Würgler, 1988) que evalúa estadísticamente las frecuencias de las manchas en las alas mediante la prueba no paramétrica de  $\chi^2$  para proporciones (de una cola), con un grado de libertad y una probabilidad de  $\leq 0.05$ .

El análisis permite decidir si la frecuencia de manchas inducidas en los tratamientos tiene un diagnóstico positivo, débil positivo, negativo o indeciso, con base en las siguientes hipótesis:

- ✦ **Hipótesis nula (H<sub>0</sub>):** La frecuencia de mutación (inducida + espontánea) de los individuos tratados no es significativamente mayor a la frecuencia del testigo negativo.
- ✦ **Hipótesis alternativa (H<sub>a</sub>):** La frecuencia de mutación (inducida + espontánea) de los individuos tratados es **m** veces mayor que la frecuencia del testigo negativo (Graf *et al.*, 1984). Donde **m** es el factor de multiplicación utilizado para realizar este análisis estadístico, indicando cuántas veces debe incrementarse el número de eventos de los tratamientos, con respecto al testigo para considerar una respuesta positiva y basado en el incremento que la radiación provocaría.

Las manchas pequeñas (1-2 células) son más comunes, por lo que predominan en relación con la frecuencia de manchas grandes (>3 células) y las manchas gemelas (expresión de los marcadores *flr*<sup>3</sup> y *mwh* en clones adyacentes). De esta manera, para considerar un incremento significativo en la frecuencia de manchas pequeñas y totales (se obtiene la suma de todas las manchas, debido a que la contribución de las manchas pequeñas es predominante) se utiliza **m=2**, mientras que para las manchas grandes y gemelas **m=5** por

ser menos comunes. Por lo que son posibles las siguientes cuatro decisiones (Frei y Würzler, 1988).

- ✦ Aceptar  $H_0$  y rechazar  $H_a$ : **negativo**
- ✦ Rechazar  $H_0$  y aceptar  $H_a$ : **positivo**
- ✦ Rechazar  $H_0$  y rechazar  $H_a$ : **débil positivo**
- ✦ Aceptar  $H_0$  y aceptar  $H_a$ : **indeciso**

A los resultados indecisos o débiles positivos, obtenidos con SMART para PC (Frei y Würzler, 1988) se les realizó la prueba de U de Mann-Whitney y Wilcoxon, que considera la variabilidad entre los individuos y no requiere una distribución normal de los datos (prueba no paramétrica) con modificaciones para una o dos colas para datos individuales, usando el programa estadístico STAT-Graphics versión 6.0, con una  $p$  menor o igual a 0.05 (Frei y Würzler, 1995).

Para el análisis de las distribuciones del tamaño de los clones *mwh* se aplicó la prueba de Kolmogorov - Smirnov (K-S). Esta es una prueba no paramétrica que permite medir el grado de concordancia entre dos distribuciones, comparando las frecuencias acumuladas de una distribución con las de otra. Cuando el valor de  $p \leq 0.05$  los resultados indican que hay diferencias significativas entre ambas distribuciones y por lo tanto una distribución es diferente a la otra.

## RESULTADOS

Al comparar los resultados obtenidos de los ensayos con los diferentes tratamientos y sus testigos no se observaron diferencias, por lo que los datos fueron agregados.

En la tabla 7 se muestra el resumen de dichos resultados después de analizar la frecuencia de manchas por individuo.

**Tabla 7.** Resumen de resultados obtenidos de SMART en ala de *Drosophila melanogaster* (Anexo III) cruce estándar (CE), después de que larvas de (72 ± 4 h) fueran alimentadas con RES (2.5, 10 y 40 µg/mL) solo y en co-tratamiento con 4-NQO (2 mM), usando como testigos negativos Agua miliQ, EtOH 1%, Acetona 2% y Acetona/EtOH 1%.

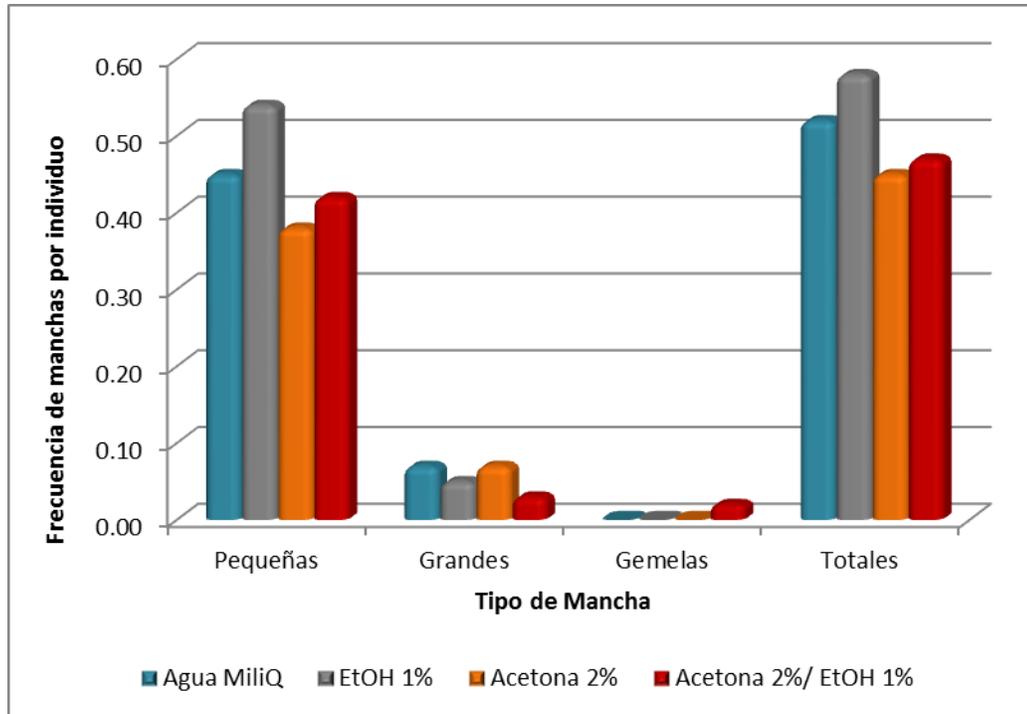
Tratamiento (Concentración)	Número de individuos	Manchas por individuo (número de manchas) diagnóstico estadístico*					clones <i>mwh</i>
		Manchas pequeñas (1-2 células) m=2	Manchas grandes (> 2 células) m=5	Manchas gemelas m=5	Manchas totales m=2		
<b>Cruza Estándar (CE)</b>							
<b>A. Testigos disolventes</b>							
Agua	58	0.45 (26)	0.07 (4)	00.0 (0)	0.52 (30)	30	
EtOH 1%	118	0.54 (58) -	0.05 (5) -	0.00 (0) -	0.58 (63) -	63	
Acetona 2%	60	0.38 (23) -	0.07 (4) -	0.00 (0) -	0.45 (27) -	27	
Acetona2%/EtOH 1%	60	0.42 (25) -	0.03 (2) -	0.02 (1) -	0.47 (28) -	28	
<b>B. Resveratrol</b>							
EtOH 1%	108	0.54 (58)	0.05 (5)	0.00 (0)	0.58 (63)	63	
RES 2.5 µg/mL	59	0.69 (41) -	0.25 (15) +	0.00 (0) -	0.95 (56) +	56	
RES 10 µg/mL	58	0.50 (29) -	0.09 (5) -	0.00 (0) -	0.59 (34) -	34	
RES 40 µg/mL	60	0.45 (27) -	0.10 (6) -	0.00 (0) -	0.55 (33) -	33	
<b>C. 4-NQO</b>							
4NQO (2.0 mM)	60	0.83 (50)	0.40 (24)	0.05 (3)	1.28 (77)	76	
Acetona 2%							
4NQO (2.0mM)	60	0.80 (48) -	0.90 (54) +	0.10 (6) -	1.80 (108) -	106	
Acetona 2%/ EtOH 1%							

<b>D. 4-NQO y co-tratamientos RES/4-NQO contra testigo negativo</b>														
Acetona 2%/EtOH 1%	60	0.42	(25)	+	0.03	(2)	+	0.02	(1)	+	0.47	(28)	+	28
4NQO (2.0mM) Acetona 2%/EtOH 1%	60	0.80	(48)	+	0.90	(54)	+	0.10	(6)	+	1.80	(108)	+	106
RES 2.5 + 4NQO (2.0 mM)	60	0.57	(34)	-	0.75	(45)	+	0.05	(3)	-	1.37	(82)	+	78
RES 10 + 4NQO (2.0 mM)	60	1.07	(64)	+	0.85	(51)	+	0.15	(9)	+	2.07	(124)	+	124
RES 40 + 4NQO (2.0 mM)	60	1.07	(64)	+	0.82	(49)	+	0.02	(1)	-	1.90	(114)	+	113
<b>E. Co-tratamientos RES/4-NQO contra testigo positivo</b>														
4NQO (2.0 mM) Acetona2%/EtOH 1%	60	0.80	(48)		0.90	(54)		0.10	(6)		1.80	(108)		106
RES 2.5 + 4NQO (2.0 mM)	60	0.57	(34)	-	0.75	(45)	-	0.05	(3)	-	1.37	(82)	-	78
RES 10 + 4NQO (2.0 mM)	60	1.07	(64)	+	0.85	(51)	-	0.15	(9)	-	2.07	(124)	-	124
RES 40 + 4NQO (2.0 mM)	60	1.07	(64)	+	0.82	(49)	-	0.02	(1)	-	1.90	(114)	-	113

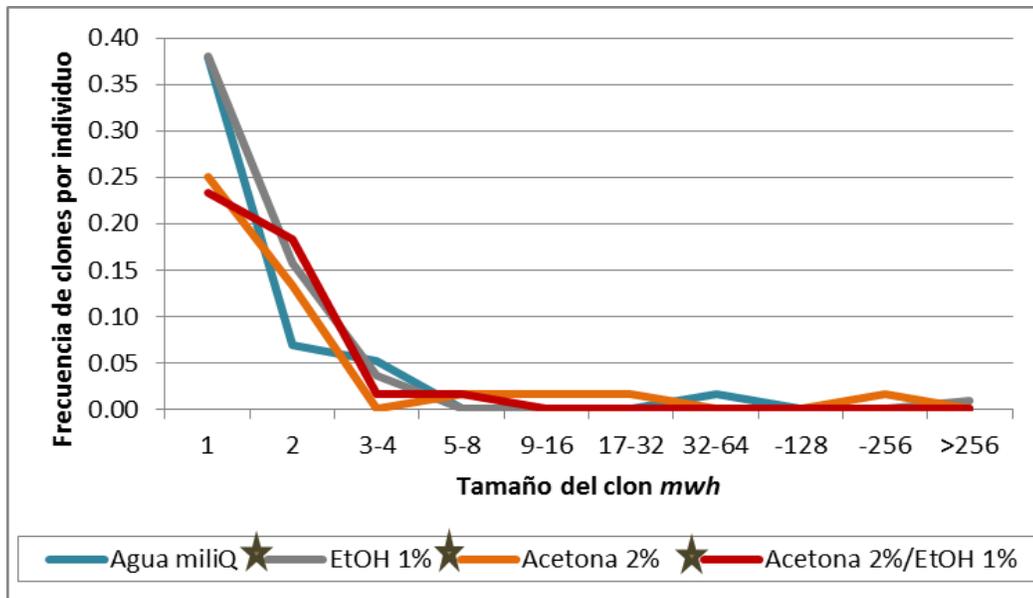
\*Diagnóstico estadístico de acuerdo con Frei y Würigler (1988, 1995) comparados con su testigo correspondiente: -, negativo; +, positivo; m, factor de multiplicación de riesgo mínimo para asignar un resultado positivo ( $p < 0.05$ ).

## Testigos disolventes

Al comparar los disolventes EtOH 1%, Acetona 2% y Acetona 2%/ EtOH 1% con el testigo negativo agua miliQ, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la frecuencia de manchas por individuo (Tabla 7-A y Gráfica 1). Sin embargo, cuando se comparó la distribución acumulada de clones *mwh* de los testigos disolventes se encontraron diferencias estadísticamente significativas (Gráfica 2), lo que sugiere que hubo una alteración del ciclo celular en la larva por parte de dichos disolventes.



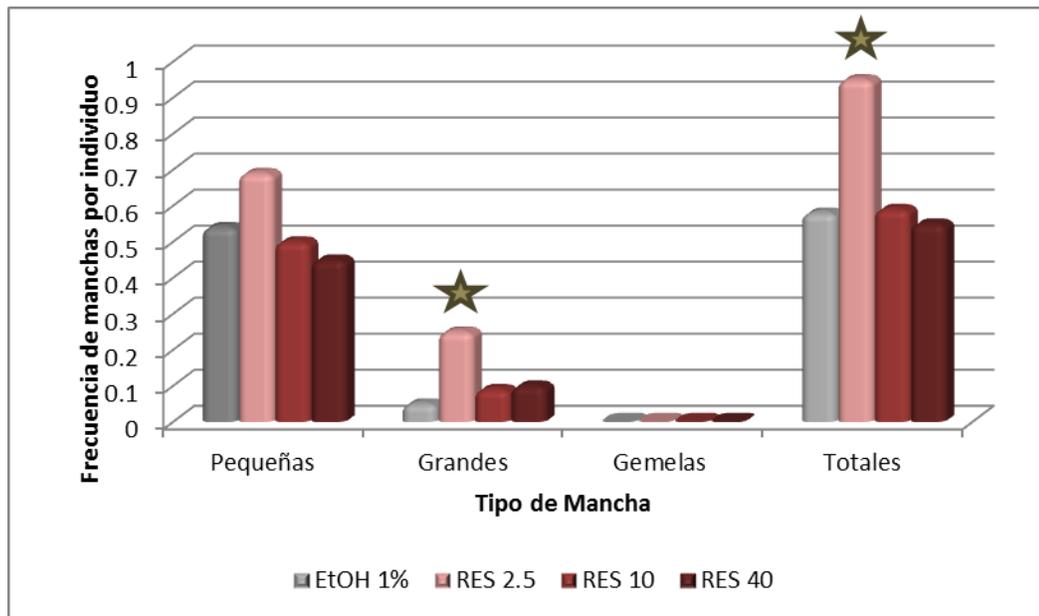
**Gráfica 1.** Frecuencia de manchas pequeñas, grandes, gemelas y totales por individuo después de los tratamientos Agua miliQ, EtOH 1%, Acetona 2% y Acetona 2%/EtOH 1%.



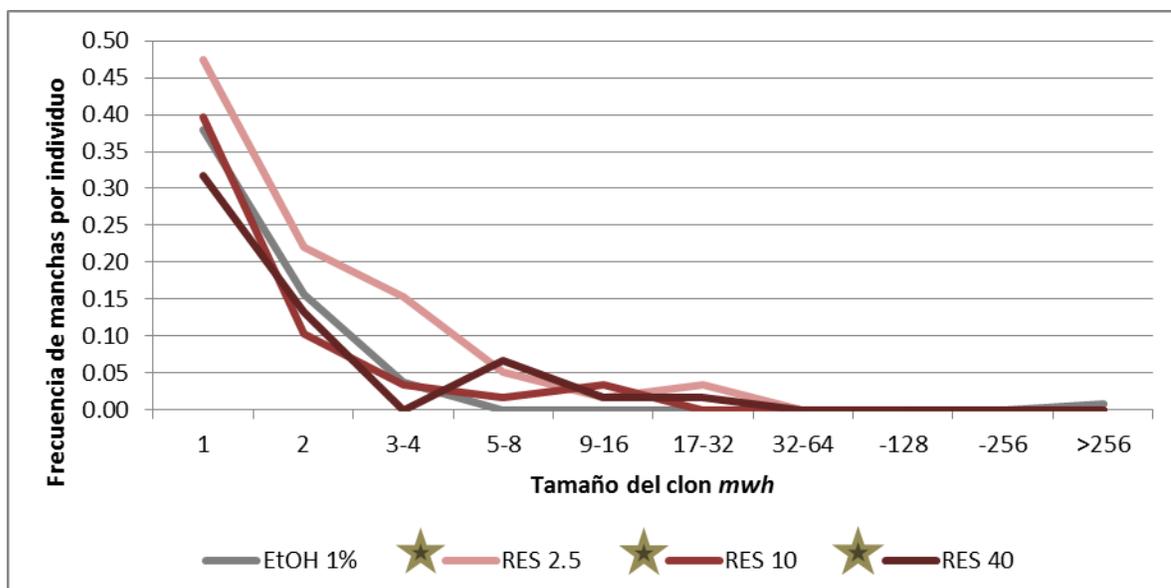
**Gráfica 2.** Distribución acumulada del tamaño de clones *mwh* por individuo después de los tratamientos Agua miliQ, EtOH 1%, Acetona 2% y Acetona 2%/EtOH 1%. Donde 1, 2, 3-4, 5-8, 9-16, 17-32, 33-64, -128, -256 y >256 es el número células somáticas mutantes y (★) señala que la distribución del tamaño de clones de los tratamientos fueron significativamente diferentes con respecto al testigo Agua miliQ.

## Resveratrol

Al comparar los tratamientos de RES (2.5, 10 y 40  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) contra el testigo EtOH 1%, se encontraron diferencias estadísticamente significativas sólo con el tratamiento de RES 2.5 en manchas grandes y totales (Tabla 7-B y Gráfica 3). No obstante, en la comparación de la distribución acumulada de clones *mwh*, todos los tratamientos con RES mostraron diferencias significativas (Gráfica 4).



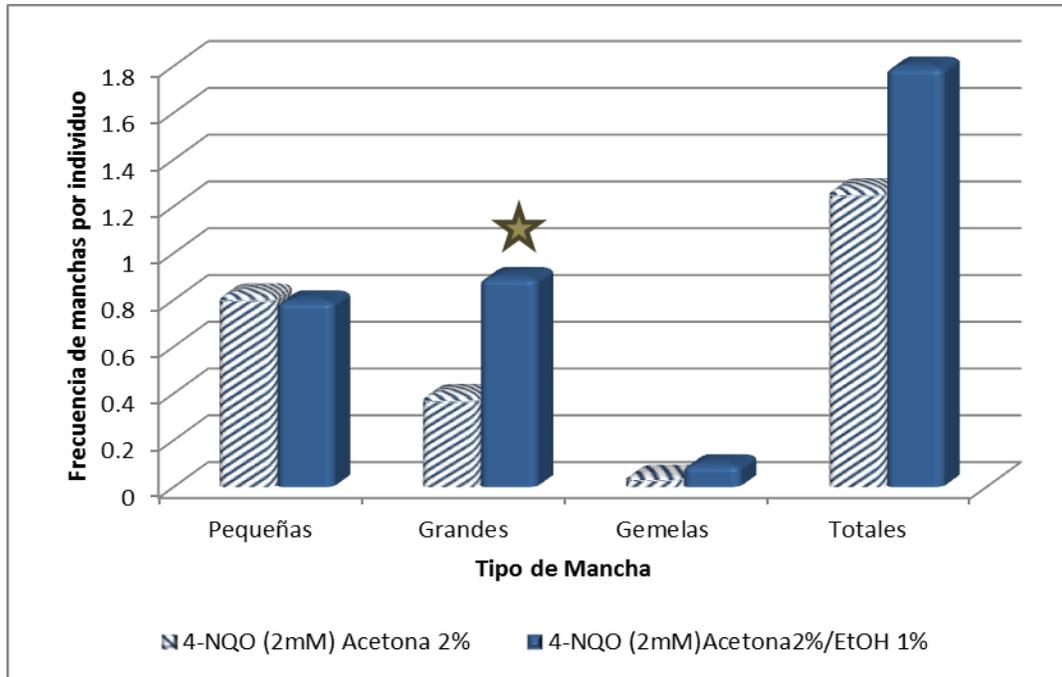
**Gráfica 3.** Frecuencia de manchas pequeñas, grandes, gemelas y totales por individuo después de los tratamientos EtOH 1% y RES (2.5, 10 y 40  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). Donde (★) indica que el tratamiento incrementó la frecuencia de manchas con respecto al testigo EtOH 1%.



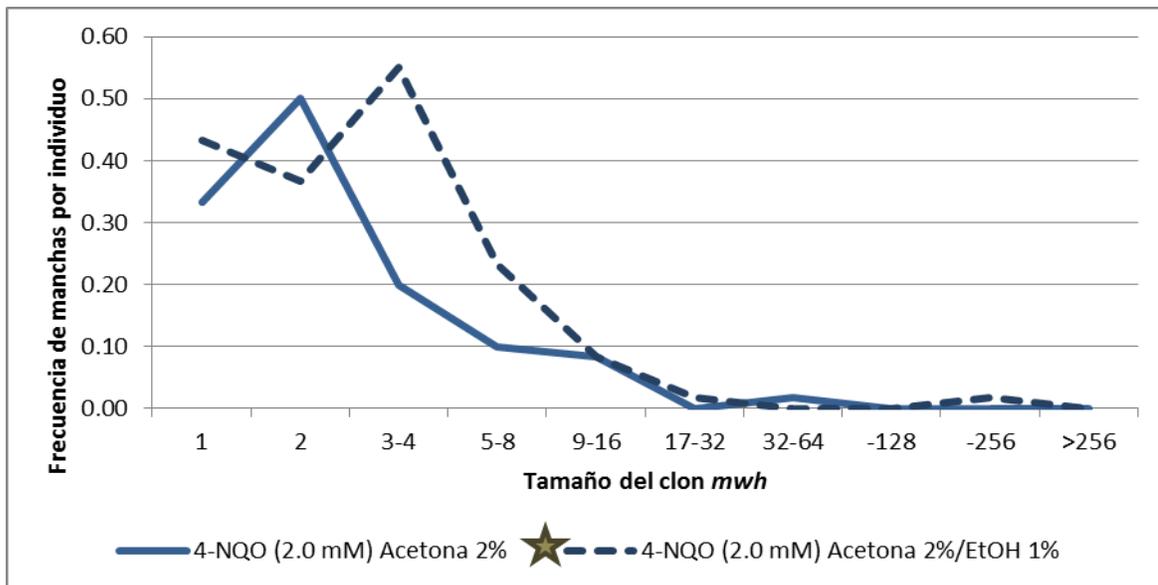
**Gráfica 4.** Distribución acumulada del tamaño de clones *mwh* por individuo después de los tratamientos EtOH 1% y RES (2.5, 10 y 40 µg/mL). Donde 1, 2, 3-4, 5-8, 9-16, 17-32, 33-64, -128, -256 y >256 es el número células somáticas mutantes y (★) señala que la distribución del tamaño de clones de los tratamientos fueron significativamente diferentes con respecto al testigo EtOH 1%.

#### 4-NQO

Al contrastar si hubo diferencias entre el tratamiento 4-NQO (2 mM) Acetona 2%/EtOH 1% respecto al 4-NQO (2 mM) Acetona 2%, sólo se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la frecuencia de manchas grandes (Tabla 7-C y Gráfica 5). De la misma manera, resultó estadísticamente significativo al comparar la distribución acumulada de clones *mwh* (Gráfica 6).



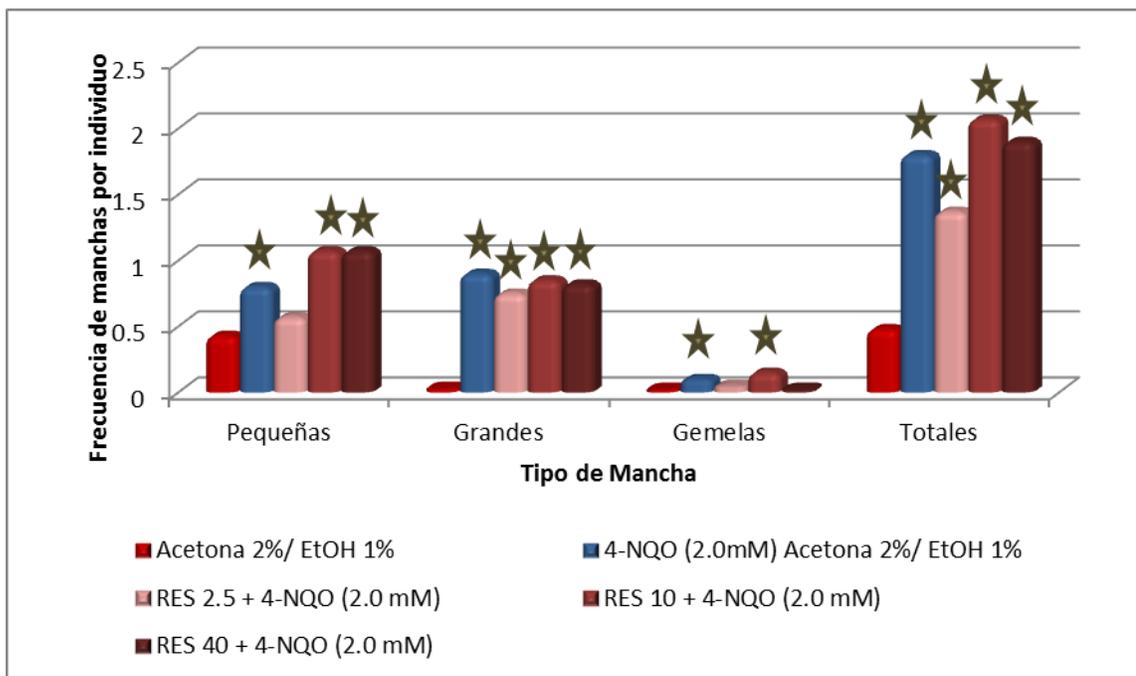
**Gráfica 5.** Frecuencia de manchas pequeñas, grandes, gemelas y totales por individuo después de los tratamientos 4-NQO (2 mM) Acetona 2% y 4-NQO (2 mM) Acetona 2%/ EtOH 1%. Donde (★) indica incremento en la frecuencia de manchas del con respecto al testigo 4-NQO (2 mM) Acetona 2%.



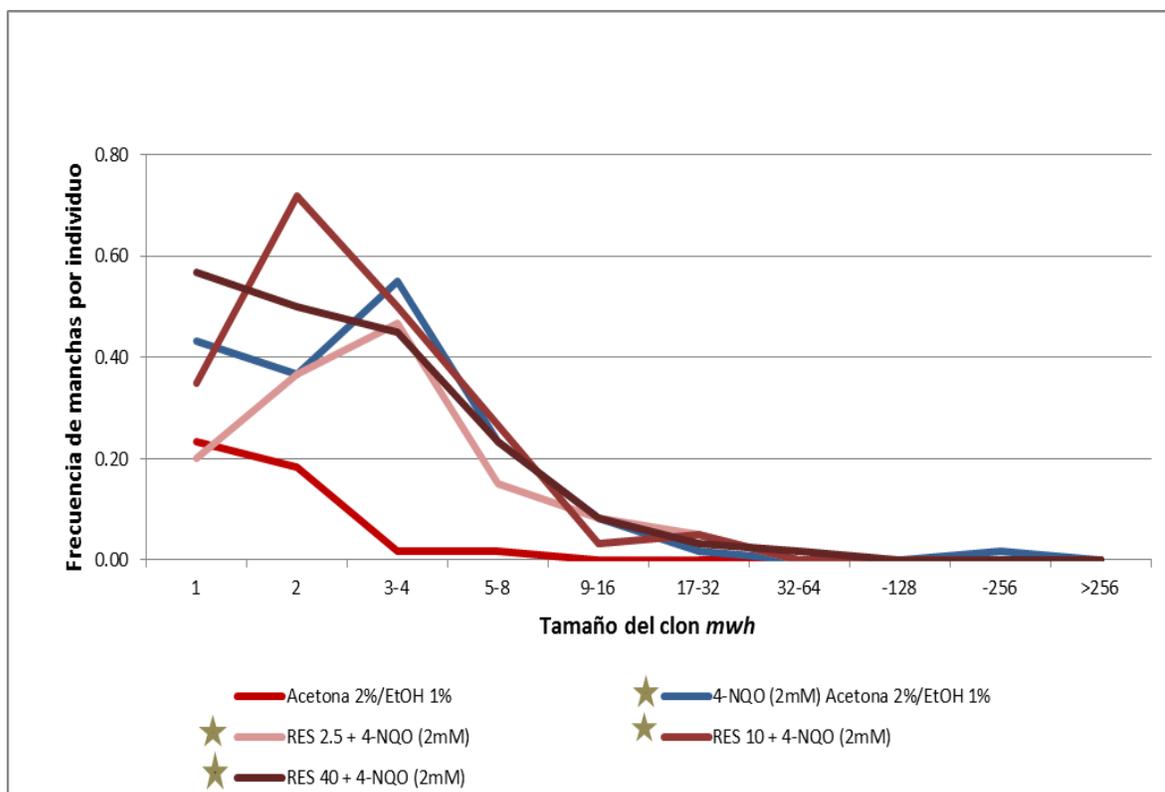
**Gráfica 6.** Distribución acumulada del tamaño de clones *mwh* por individuo después de los tratamientos 4-NQO (2 mM) Acetona 2% y 4-NQO (2 mM) Acetona 2%/EtOH 1%. Donde 1, 2, 3-4, 5-8, 9-16, 17-32, 33-64, -128, -256 y >256 es el número células somáticas mutantes y (★) señala que la distribución del tamaño de clones de los tratamientos fueron significativamente diferentes con respecto al testigo 4-NQO (2 mM) Acetona 2%.

#### 4-NQO y co-tratamientos RES/4-NQO contra testigo negativo

Al comparar la frecuencia de manchas de los co-tratamientos RES (2.5, 10 y 40  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) con 4-NQO (2 mM) y el tratamiento 4-NQO (2 mM) Acetona 2%/EtOH 1% contra el testigo negativo Acetona 2%/EtOH 1%, se obtuvo que en manchas pequeñas, todos los tratamientos excepto el co-tratamiento RES 2.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  mostraron diferencias estadísticamente significativas. Por otra parte en manchas gemelas se obtuvieron los mismos resultados en el tratamiento con 4-NQO (2 mM) Acetona 2%/EtOH 1% y el co-tratamiento con RES 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . A su vez las frecuencias de manchas grandes y totales mostraron que todos los tratamientos tuvieron diferencias respecto a su testigo negativo Acetona 2%/EtOH 1% (Tabla 7-E Gráfica 9). Ocurriendo lo mismo en la comparación de la distribución acumulada de clones *mwh* de los tratamientos antes mencionados, con respecto al testigo negativo Acetona 2%/EtOH 1% (Gráfica 10).



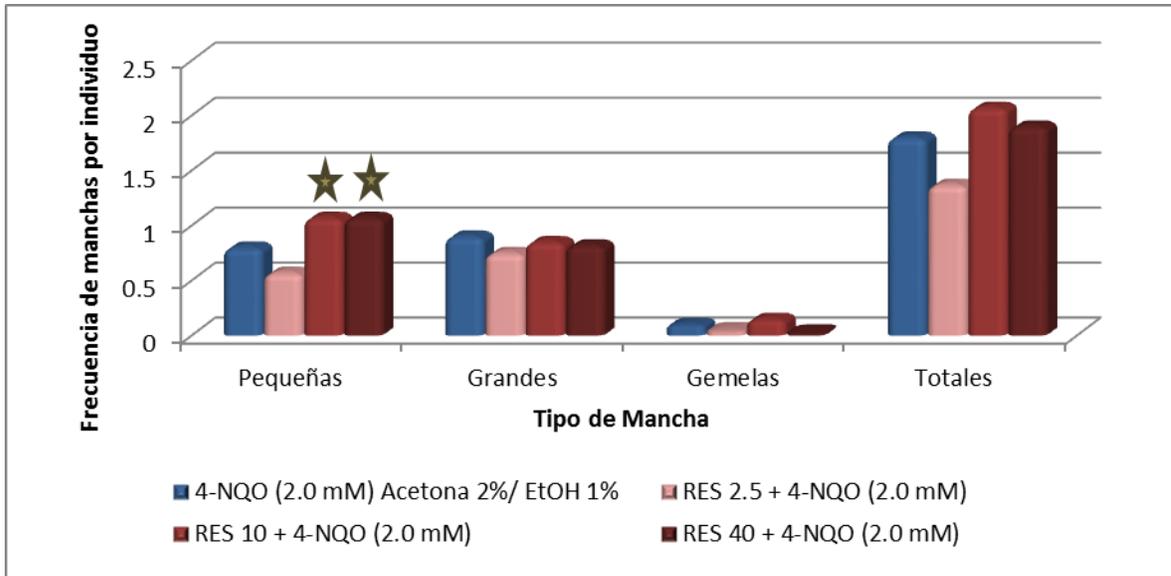
**Gráfica 7.** Frecuencia de manchas pequeñas, grandes, gemelas y totales por individuo después de los co-tratamientos 4-NQO (2 mM) Acetona 2%/ EtOH 1% y RES (2.5, 10 y 40  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). Donde (★) indica incremento estadísticamente significativo del tratamiento con respecto al testigo Acetona 2%/EtOH 1%.



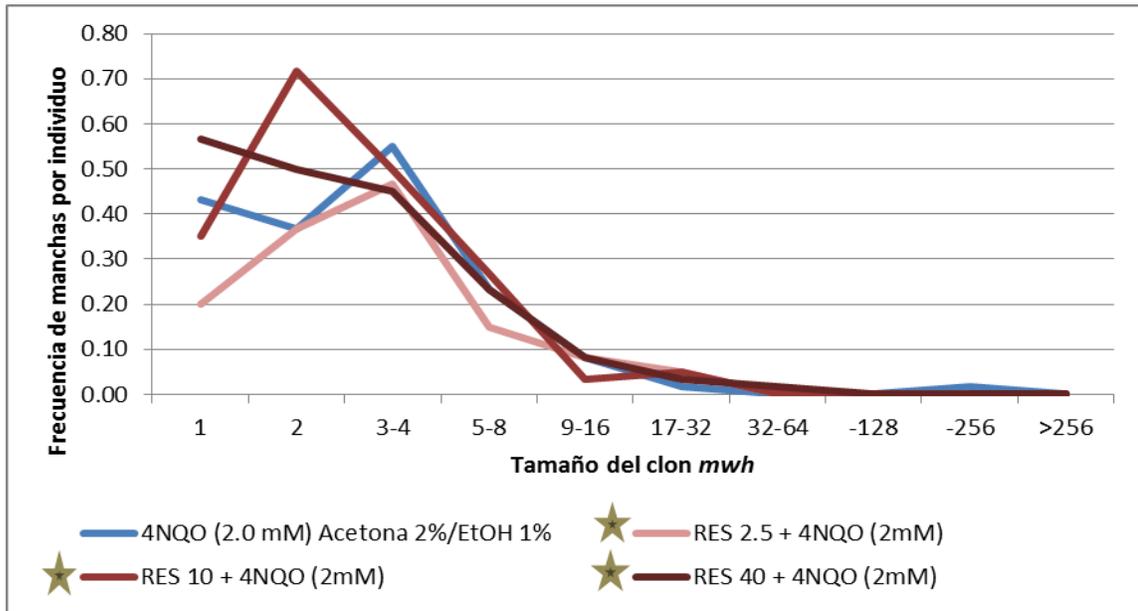
**Gráfica 8.** Distribución acumulada del tamaño de clones *mwh* por individuo después de los co-tratamientos 4-NQO Acetona 2%/EtOH 1% y RES (2.5, 10 y 40 µg/mL). Donde 1, 2, 3-4, 5-8, 9-16, 17-32, 33-64, -128, -256 y >256 es el número células somáticas mutantes y (★) señala que la distribución del tamaño de clones de los tratamientos fueron significativamente con respecto al testigo Acetona 2%/EtOH 1%.

### Co-tratamientos RES/4-NQO contra testigo positivo

Al hacer la comparación entre los co-tratamientos RES (2.5, 10 y 40 µg/mL) con 4-NQO (2 mM) contra el testigo 4-NQO (2 mM) Acetona 2%/EtOH1%, los co-tratamientos RES 10 µg/mL y 40 µg/mL mostraron diferencias estadísticamente significativas sólo en la frecuencia de manchas pequeñas (Tabla 7-D y Gráfica 7). Sin embargo, en la comparación de la distribución acumulada de clones *mwh*, todos los co-tratamientos presentaron diferencias (Gráfica 8).



**Gráfica 9.** Frecuencia de manchas pequeñas, grandes, gemelas y totales por individuo después de los co-tratamiento 4-NQO (2 mM) Acetona 2%/ EtOH 1% y RES (2.5, 10 y 40 µg/mL). Donde (★) indica incremento estadísticamente significativo del tratamiento con respecto al testigo 4-NQO (2 mM) Acetona 2%/EtOH 1%.



**Gráfica 10.** Distribución acumulada del tamaño de clones *mwh* por individuo después de los co-tratamientos 4-NQO (2 mM) Acetona 2%/EtOH 1% y RES (2.5,10 y 40 µg/mL). Donde 1, 2, 3-4, 5-8, 9-16, 17-32, 33-64, -128, -256 y >256 es el número células somáticas mutantes y (★) señala que la distribución del tamaño de clones de los tratamientos fueron significativamente con respecto al testigo 4-NQO (2 mM) Acetona 2%/EtOH 1%.

## DISCUSIÓN

### Testigos disolventes

Los tratamientos EtOH 1%, Acetona 2% y Acetona 2%/ EtOH 1% no mostraron diferencias significativas en la frecuencia de manchas respecto al agua, entonces podemos asegurar que estos disolventes no tuvieron ningún efecto genotóxico a esas concentraciones (Tabla 7-A; Gráfica 1). Sin embargo, se presentaron diferencias significativas en la distribución del tamaño de clones *mwh* en todos los tratamientos antes mencionados, lo que indica que alteraron la división celular (Gráfica 2). Según McClure y colaboradores en 2011, en larvas de *Drosophila melanogaster*, el EtOH (5% y 10%) altera la división celular tanto de cerebro como de discos imaginales, reduciendo significativamente el tamaño de las larvas debido a la disminución de la proliferación celular. Igualmente, desde 1962 Pace y Elliott probaron, en cultivos de células de piel humanas, que la acetona a concentraciones de 10µg/mL mostraba una clara inhibición celular. Pese a los resultados reportados, en este trabajo la acetona fue utilizada para disolver el 4-NQO ya que no era posible hacerlo con EtOH.

### Resveratrol

A diferencia de Chen y colaboradores que en 2013 establecieron que concentraciones de RES de 5.7 µg/mL y menores no presentaban ningún efecto citotóxico, en este trabajo se encontró que los tratamientos con RES mostraron diferencias significativas con respecto al testigo EtOH a la concentración 2.5 µg/mL de RES, en el tipo de manchas grandes, lo que también se vio reflejado en la frecuencia de manchas totales (Tabla 1-B; Gráfica 3). Esto nos indica que esta concentración de RES indujo un efecto genotóxico directo. Este estudio confirma los resultados reportados previamente por Gómez (2013) quien encontró esta concentración (2.5 µg/mL) positiva en manchas pequeñas y grandes, por lo tanto, también en totales. Esto, también coincide con los resultados obtenidos por Schmitt y colaboradores que en el año 2002 probaron la misma concentración de RES en células de linfoma de ratón y observaron una inducción significativa de micronúcleos. Ellos

sugieren que el RES podría inhibir el ensamblado del microtúbulo y así provocar alteraciones mitóticas. En el mismo trabajo, en la línea celular MDA-MB-231, encontraron inhibición en el crecimiento, lo que de acuerdo con Chen y colaboradores podría estar relacionado con el daño en cromosomas

Además, Mitrut y colaboradores en el 2009 evaluaron la actividad genotóxica del RES en células de adenocarcinoma gástrico, mostrando una inducción dosis-dependiente de micronúcleos, donde se presentó una alta frecuencia a las concentraciones de 10 y 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de RES. Estos micronúcleos se forman debido a una ruptura cromosómica, los fragmentos de los cromosomas pueden no estar incluidos en los núcleos de las células hijas tras la división y así formar los micronúcleos en el citoplasma de estas células.

Posteriormente, Matsuoka y colaboradores, en el 2001 determinaron que el RES indujo, en la línea celular CHL, aberraciones cromosómicas, principalmente intercambio y ruptura de cromátides, de manera dosis-dependiente (2.5-20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), donde la concentración más elevada también mostró inhibición de la proliferación celular. Además, revelaron que el RES es capaz de producir aberraciones cromosómicas numéricas, mientras que las células con aneuploidía incrementaron con los tratamientos de RES 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  a 48 h y 5.0 y 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  a 72 h de tratamiento.

Por otra parte, Chan y Chang, en el 2006, estudiaron en ensayos *in vitro* que el RES en pre-tratamientos, a concentraciones 2.5-6.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  inhibía la activación de la caspasa-3 inducida por altas dosis de etanol (200 mM), mientras que a altas concentraciones (20-40  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) el RES parecía aumentar la apoptosis. Esta última referencia apoyaría los resultados obtenidos en el presente trabajo en el que no se encontró efecto genotóxico a las concentraciones 10 y 40  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

Recientemente Meira y colaboradores (2013) también demostraron *in vitro* que tratamientos con RES (11.4  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) reducían significativamente la viabilidad de las células GRX, reduciendo considerablemente la sobrevivencia y densidad poblacional de éstas, mientras que los tratamientos con 17 y 22  $\mu\text{g}/\text{mL}$  resultaron en la muerte de todas las células a lo largo de los tiempos establecidos para estos tratamientos (24 y 120 h). Lo que indica que existe un efecto dosis-dependiente del RES con respecto a la supervivencia y

viabilidad de las células. Igualmente mostraron que los tratamientos entre 0.22 y 11  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de RES, expuestos a 24 h provocaron un efecto pro-oxidante dosis-dependiente en las células GRX. Resultados similares encontraron en las células GRX tratadas durante 120 h, en este caso, el RES también promovió efectos prooxidantes desde la dosis más baja (0.022  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ).

#### **4-NQO**

La carcinogenicidad del 4-NQO puede ser provocada por aductos en el DNA, principalmente en bases de guanina y en menor medida en bases de adenina, después de ser metabolizado a 4-hidroxi-aminoquinolina 1-óxido que provoca daño oxidativo mediante la formación de 8OHdG (Galiègue-Zouitina *et al.*, 1985; Bailleul *et al.*, 1898; Arima *et al.*, 2006).

El emparejamiento de 8 OHdG con adenina, así como con citosina, durante la replicación del DNA deriva en transversiones. De hecho estas mutaciones son predominantes en tumores inducidos por 4-NQO (Ide *et al.*, 2001). Así mismo, induce estrés oxidativo intracelular, dando como resultado mutaciones y ruptura de cadenas de DNA, similares a las alteraciones genéticas provocadas por los carcinógenos del tabaco (Kanojia y Vaidya, 2006; Ikenaga *et al.*, 1975b; Kim *et al.*, 2006).

En este trabajo se encontró al tratamiento con 4-NQO (2 mM) Acetona 2%/EtOH 1% más genotóxico que el testigo 4-NQO (2 mM) sin EtOH (Tabla 7-C; Gráfica 5). Se propone que la combinación de acetona y etanol hicieron más soluble al compuesto, lo que provocó más daño en las células. Por su parte LeBlanc y Surprenant, en 1983, probaron que la acetona presenta toxicidad aguda, ya que redujo significativamente la supervivencia de *Daphnia magna* (pulgas de agua) expuestas a diferentes concentraciones de ésta. Sumado a esto, el EtOH es metabolizado a acetaldehído, que parece ser el mecanismo más importante por el cual el consumo de alcohol induce cáncer (Brooks y Theruvathu, 2005). Según Woutersen y colaboradores, en 1986, la exposición a acetaldehído incrementa significativamente la incidencia de tumores nasales, esto hace evidente que éste puede

tener por sí solo un efecto carcinógeno. Por otro lado, Obe y Anderson, en 1987, revelaron que la exposición a acetaldehído incrementa la frecuencia del intercambio de cromátidas hermanas y aberraciones cromosómicas en células de mamífero, incremento en la inducción de cromátidas hermanas es considerado una medida de genotoxicidad extremadamente sensible (Hengstler *et al.*, 2003). La lesión más conocida y mejor estudiada en el DNA a consecuencia del acetaldehído es el aducto N2-etil-2'-desoxiguanosina (N2-etil-dG), resultante de la reacción de acetaldehído y desoxinucleósidos (Brooks y Theruvathu, 2005).

#### **4-NQO y co-tratamientos RES/4-NQO contra testigo negativo**

Como era de esperarse, en este ensayo la mayoría de los tratamientos resultaron positivos respecto al testigo Acetona 2%/EtOH 1%, a excepción del co-tratamiento 4-NQO/RES (2.5 µg/mL), ya que en manchas pequeñas y gemelas (Tabla 7 E; Gráfica 9) no se encontraron diferencias significativas con respecto al testigo negativo, lo que podría interpretarse como un efecto protector del RES a esta concentración. Sin embargo, al compararlo con el testigo 4-NQO, no se encontraron diferencias significativas, aunque se observó una tendencia a la disminución en la frecuencia de manchas. Por otro lado, si consideramos que a esta concentración el RES resultó genotóxico (como se muestra en la Tabla 7-B; Gráfica 3), esta disminución podría ser consecuencia del efecto pro-oxidante del RES (Alarcón de la Lastra y Villegas, 2007) y/o debido a la apoptosis inducida por el 4-NQO (Hana *et al.*, 2007). De la misma manera podría explicarse la disminución en la frecuencia de manchas gemelas, para el co-tratamiento 4NQO/RES (40 µg/mL).

#### **Co-tratamientos RES/4-NQO contra testigo positivo**

En este ensayo se muestra que los co-tratamientos de RES 10 µg/mL con 4-NQO (2 mM) y RES 40 µg/mL con 4-NQO (2 mM) resultaron positivos solamente en manchas pequeñas (Tabla 7-E; Gráfica 7), lo que muestra un efecto genotóxico tardío por parte de éstos. Lo

cual se opone a los datos obtenidos por Attia, en 2012, quien encontró utilizando el ensayo cometa que, cuando se administraban diferentes dosis de RES (50 y 100 mg/kg) en pre-tratamiento a ratones éste disminuía el daño al DNA provocado por cDDP, reduciendo la frecuencia en el rompimiento de hebras, encontrando que a dosis más altas había una reducción más efectiva. Por otra parte Attia (2012) encontró en el ensayo de micronúcleos una ligera protección por parte del RES, sin embargo, ésta no fue estadísticamente significativa en comparación con el cDDP solo. Además al suministrar dosis altas de RES (100 mg/kg) antes del tratamiento con cDDP, había una disminución en la genotoxicidad, reduciendo aberraciones cromosómicas inducidas por cDDP en espermatogonias. Mientras que en espermatoцитos tratados con ambas dosis de RES (50 y 100 mg/kg), se encontró que el RES redujo la frecuencia de aberraciones cromosómicas inducidas por cDDP.

Por su parte, Chen y colaboradores en 2013 encontraron que el RES a bajas concentraciones (0.22 y 1.14  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) en co-tratamientos con  $\text{NaAsO}_2$  (30  $\mu\text{M}$ ) mostró efecto protector en células de adenocarcinoma epitelial de pulmón humano.

De acuerdo con lo anterior, en la prueba de micronúcleos, encontraron que en co-tratamientos con dosis bajas de RES (0.22 y 1.14  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) existía una clara disminución en la frecuencia de micronúcleos. Así mismo, encontraron resultados similares en el ensayo cometa, donde las células fueron sometidas a las mismas condiciones, en la exposición de células a  $\text{NaAsO}_2$  y bajas concentraciones de RES (0.22 y 1.14  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) se redujo significativamente el daño al DNA inducido por  $\text{NaAsO}_2$ , demostrado por la reducción de la longitud del cometa.

Por otro lado, nuestros resultados concuerdan con lo registrados por Chen y colaboradores en 2013, donde sometieron a líneas celulares A549 a co-tratamientos con diferentes concentraciones de RES y  $\text{NaAsO}_2$  (30  $\mu\text{M}$ ), el cual eleva la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), encontrando que el co-tratamiento con RES 2.28  $\mu\text{g}/\text{mL}$  mostraba una ligera inhibición del crecimiento celular, lo que representa un posible mecanismo involucrado en el daño al DNA (Mei *et al.*, 2003). Mientras que concentraciones más elevadas de RES (4.56  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) aumentaron la citotoxicidad de

NaAsO<sub>2</sub>, mostrando efecto inhibitorio en la viabilidad de las células. Por otro lado, esta misma concentración, también pareció incrementar significativamente la proliferación celular, comparado con NaAsO<sub>2</sub> solo. Mediante el ensayo cometa, determinaron que el daño inducido al DNA por NaAsO<sub>2</sub> fue agravado a altas concentraciones de RES (4.56 µg/mL), esto debido al incremento en los niveles de ROS (Chen *et al.*, 2013). Bajo las mismas condiciones, encontraron, en el ensayo de micronúcleos, incremento en la frecuencia de células micronucleadas.

De Salvia y colaboradores en 2002, también evaluaron el efecto genotóxico del RES, al someter células de ovario de hamster Chino (CHO) a tratamientos con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> para provocarles aberraciones cromosómicas y después añadir RES a diferentes concentraciones (11, 22 y 44 µg/mL), obteniendo un evidente incremento en el porcentaje de células anormales con la concentración más alta (44 µg/mL). Cuando las células fueron pre-tratadas con RES, se presentó un incremento de aberraciones cromosómicas de manera dosis dependiente. El índice mitótico fue fuertemente afectado, independientemente de las concentraciones de RES empleadas, tal como se obtuvo en este trabajo

En 2006 Zheng y colaboradores probaron que el RES a altas concentraciones (44 µg/mL) puede ser pro-oxidante en presencia de Cu (II), al inducir daño al DNA en la línea celular HL-60. Mientras que Ahmad y colaboradores en 2005 encontraron que el RES es capaz de unirse al cobre presente en la cromatina y formar un complejo que lleva a la generación de ROS. Mostrando que la frecuencia de mutaciones era mayor en plásmidos tratados con RES y Cu (II) simultáneamente, en comparación con mutaciones espontáneas, presentando un comportamiento dosis- dependiente (2.28, 4.56, 11.4, 22.8, 34.2 y 45.6 µg/mL) en la frecuencia de las mutaciones. También revelaron que en los tratamientos con RES, solo o en presencia de Cu (II), resultó un incremento en el porcentaje de mutaciones por delección. En casi todas las concentraciones de RES probadas con Cu (II) el porcentaje de mutaciones por delección fue el más alto, a las mínimas concentraciones de RES (2.28, 4.56 y 11.4 µg/mL), las inserciones fueron casi ausentes, sin embargo, se encontraron incrementadas a altas concentraciones (34.2 y 45.6 µg/mL).

## CONCLUSIONES

- ✦ Los testigos disolventes y el RES tuvieron efecto en la división celular, ya que la distribución del tamaño de clones *mwh* fue alterada.
- ✦ El daño provocado por el mutágeno 4-NQO es agravado cuando éste es disuelto con EtOH y Acetona; se propone que esto favoreció su entrada a las células.
- ✦ El tratamiento RES 2.5 µg/mL aumentó significativamente la frecuencia de manchas grandes, lo que indica que este compuesto provoca un efecto genotóxico temprano.
- ✦ El mecanismo de acción del RES parece ser diferente dependiendo de la concentración utilizada.
- ✦ Los co-tratamientos RES/4-NQO resultaron positivos con respecto al testigo negativo en este ensayo, sugiriendo que no se redujo el efecto genotóxico de este cancerígeno.
- ✦ El RES es capaz de modular la genotoxicidad inducida por el 4-NQO.

## REFERENCIAS

- ✦ Agarwal K., Sharma A. y Talukder G. (1989). Effects of copper on mammalian cell components. *Chemico-biological Interactions*. **69**: 1-16.
- ✦ Agency for toxic substances and disease registry (ATSDR). What is cancer? [En línea. Consulta: Junio, 2013]. Disponible en: <http://www.atsdr.cdc.gov/com/cancer.pdf>.
- ✦ Ahmad A., Syed F., Singh S. y Hadi S. (2005). Prooxidant activity of resveratrol in the presence of copper ions: Mutagenicity in plasmid DNA. India. *Toxicology Letters*. **159**:1-12.
- ✦ Alarcón de la Lastra C. y Villegas I. (2007). Resveratrol as an antioxidant and pro-oxidant agent: mechanisms and clinical implications. *Biochemical Society Transactions*. **35(5)**: 1156-1160.
- ✦ Amorós M. (2001) Estudio de mutantes del cromosoma III de *Drosophila melanogaster*: el gen ash-2 como regulador de diferenciación celular. Tesis, Universidad de Barcelona.
- ✦ Amri A., Chaumeil J., Sfar S. y Charrueau C. (2012). Administration of resveratrol: What formulation solutions to bioavailability limitations?. *Journal of Controlled Release*. **158**: 182-193.
- ✦ Arima Y., Nishigori C., Takeuchi T., Oka S., Morimoto K., Utani A. y Yoshiki M. (2006). 4-Nitroquinoline 1-Oxide forms 8-hydroxydeoxyguanosine in human fibroblasts through reactive oxygen species. *Toxicological Sciences*. **91(2)**: 382-392.
- ✦ Asensi M., Medina I., Ortega A., Carretero J., Baño C., Obrador E. y Estrela J. (2002). Inhibition of cancer growth by resveratrol is related to its low bioavailability. *Free Radical Biology & Medicine*. **33(3)**: 387-398.
- ✦ Attia S. (2012). Influence of resveratrol on oxidative damage in genomic DNA and apoptosis induced by cisplatin. *Mutation Research*. **741**:22-31.
- ✦ Bailleul B., Daubersics P., Galiègue-Zouitina S. y Loucheux-Lcfebvre M. (1989). Molecular basis of 4-nitroquinoline 1-oxide carcinogenesis. *Cancer Research*. **80**:691-697.

- ✦ Baker B., Carpenter A. y Ripoll P. (1978). The utilization during mitotic cell division of loci controlling meiotic recombination and disjunction in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*. **90**: 531-578.
- ✦ Baker B. y Smith D. (1979). The effects of mutagen-sensitive mutants of *Drosophila melanogaster* in nonmutagenized cells. *Genetics*. **92**: 833-847.
- ✦ Bate M. y Martínez A. (1991). The embryonic origin of imaginal discs in *Drosophila*. *Development*. **112**: 755-761.
- ✦ Bertelli A., Bertelli A., Gozzini A. y Giovannini L. (1998). Plasma and tissue resveratrol concentrations and pharmacological activity. *Drugs under Experimental and Clinical Research*. **24(3)**: 133-138.
- ✦ Baur J. y Sinclair D. (2006). Therapeutic potential of resveratrol: the in vivo evidence. *Nature Reviews*. **5**:493-506.
- ✦ Beckman K. y Ames B. (1997). Oxidative decay of DNA. *Journal of Biological Chemistry*. **272**: 19633-19636.
- ✦ Belguendouz L., Fremont L. y Linard A. (1997). Resveratrol inhibits metal ion-dependent and independent peroxidation of porcine low-density lipoproteins. *Biochemical Pharmacology*. **53(9)**: 1347-1355.
- ✦ Bhat K. y Pezzuto J. (2002). Cancer chemopreventive activity of resveratrol. *Annals New York Academy of Sciences*. **957**: 210-229.
- ✦ Blecher E., Chaney-Graves K., DeSantis C., Edwards B., Ferlay J., Forman D., Grey N., Harford J., Kramer J., McMikel A., McNeal B., O'Brien M., Pace L., Parkin M., Robbins A., Sankaranarayanan R., Sitas F., Sloan R., Sullivan K., Wagner D. y Ward E. (2011). Global cancer facts and figures. 2<sup>nd</sup> edición. America Cancer Society. 57p.
- ✦ Boocock D., Faust G., Patel K., Schinas A., Brown V., Ducharme M., Booth T., Crowell J., Perloff M., Gescher A., Steward W. y Brenner D. (2007). Phase I dose escalation pharmacokinetic study in healthy volunteers of resveratrol, a potential cancer chemopreventive agent. *Cancer Epidemiology Biomarkers Prevention*. **16**:1246-1252.

- ✦ Brooks P. y Theruvathu J. (2005). DNA adducts from acetaldehyde: implications for alcohol-related carcinogenesis. *Alcohol*. **35**:187-193.
- ✦ Burns T. y El-deriry W. (1999). The p53 pathway and apoptosis. *Cell Physiology*. **181**: 231-239.
- ✦ Cadenas S. y Barja G. (1999). Resveratrol, melatonin, vitamin E, and PBN protect against renal oxidative DNA damage induced by the kidney carcinogen KBrO<sub>3</sub>. *Free Radical Biology and Medicine*. **26**: 1531-1537.
- ✦ Centro de Información Estadística y Documental para el Desarrollo (CIEDD). Cáncer. [En línea. Consulta Junio, 2013]. Disponible en: [http://www.ciedd.oaxaca.gob.mx/info/pdf/cancer\\_en\\_oaxaca.pdf](http://www.ciedd.oaxaca.gob.mx/info/pdf/cancer_en_oaxaca.pdf).
- ✦ Chan W. y Chang Y. (2006). Dosage effects of resveratrol on ethanol-induced cell death in the human K562 cell line. *Toxicology letters*. **161**:1-9
- ✦ Chen C., Jiang X., Zhao W. y Zhang Z. (2013). Dual role of resveratrol in modulation of genotoxicity induced by sodium arsenite via oxidative stress and apoptosis. *Food and Chemical Toxicology*. **59**:8-17.
- ✦ Cottart C., Nivet-Antoine V., Laguillier-Morizot C. y Beaudeau J. (2010). Resveratrol bioavailability and toxicity in humans. *Molecular Nutrition Food Research*. **54**: 1-10.
- ✦ Crozier A., Jaganath I. y Clifford M. (2009). Dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on health. *Natural Product Reports*. **26**:1001-1043.
- ✦ Curtis H., Barnes N., Schnek A. y Massarini A. 7<sup>a</sup> edición en español. Curtis Biología. Editorial Médica Panamericana. 2008. 290-292 p.
- ✦ D'Archivio M., Filesi C., Di Benedetto R., Gargiulo R., Giovannini C. y Masella R. (2007). Polyphenols, dietary sources and bioavailability. *Ann Ist Super Sanità*. **43(4)**: 348-361.
- ✦ De Andrade H., Reguly M. y Lehmann M. (2004). Wing Somatic Mutation and Recombination Test. *Methods in Molecular Biology*. 389-412 p

- ✦ Delmas D., Lançon A., Colin D., Jannin B. y Latruffe N. (2006). Resveratrol as a chemopreventive agent: a promising molecule for fighting cancer. *Bentham Science Publishers*. **7**(3): 1-19
- ✦ De Salvia R, Festa F., Ricordy R., Perticone P. y Cozzi R. (2002). Resveratrol affects in a different way primary versus fixed DNA damage induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in mammalian cells in vitro. *Toxicology Letters*. **135**:1-9.
- ✦ Domínguez L. (2004). Principios generales de carcinogénesis: Carcinogénesis química y hormonal. Instituto Canario de Investigación de Cáncer. *Biocáncer*.
- ✦ Droge W. (2002). Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiological Reviews*. **82**: 47-95.
- ✦ Dueñas I., Heres M., Castañeda L., Graf U. (2002). Easy raising of *Drosophila melanogaster* on a medium consisting of mashed potato flakes and a preservative solution *Drosophila Information Service*. **84**: 166.
- ✦ Elbling L., Weiss R., Teufelhofer O., Uhl M., Knasmueller S., Schulte-Hermann R., Berger W. y Micksche M. (2005). Green tea extract and (-) - epigallocatechin-3-gallate, the major tea catechin, exert oxidant but lack antioxidant activities. *The FASEB Journal*. **19**:807-809.
- ✦ Ennis G. (2001). Mutagenesis. University of Louisiana, Lafayette, Louisiana, USA. *Encyclopedia of Life Sciences*.
- ✦ Ferreira M., Gomes D., da Silva L., Vitorino S., Alvarez J. y Vieira M. (2006). Immunohistochemical evaluation of metallothionein in palatal mucosal cells of mice treated with 4NQO. *Oral Medicine and Pathology*. **11**(4): 315-318.
- ✦ Fetzner S. (2013). Biodegradation of xenobiotics. *Biotechnology*.
- ✦ Frei H. y Würigler F. (1988). Statistical methods to decide whether mutagenicity test data from *Drosophila* assays indicate a positive, negative, or inconclusive result. *Mutation Research*. **203**(4):297-308.

- ✦ Frei H. y Würigler F. (1995). Optimal experimental design and sample size for the statistical evaluation of data from somatic mutation and recombination tests (SMART) in *Drosophila*. *Mutation Research*. **334(2)**: 247-258.
- ✦ Frémont L. (2000). Biological effects of resveratrol. *Life Science*. **66(8)**: 663-673.
- ✦ Frölich A. y Würigler F. (1989). New tester strains with improved bioactivation capacity for the *Drosophila* wing-spot test. *Mutation Research*. **216(3)**: 179-187.
- ✦ Galiègue-Zouitina S., Bailleul B. y Loucheux-Lefebvre M. (1985). Adducts from in vivo Action of the carcinogen 4-Hydroxyaminoquinoline 1-Oxide in rats and from in vitro reaction of 4-Acetoxyaminoquinoline 1-Oxide with DMA and polynucleotides. *Cancer Research*. **45**:520-525.
- ✦ Gambini J., López R., Olaso G., Inglés M., Abdelazida K., Alamia M., Bonet V., Borrás C. y Viña J. (2013). Resveratrol: distribución, propiedades y perspectivas. *Geriatría y Gerontología*. **48(2)**: 79-88.
- ✦ García A. (2010). Evaluación de la actividad fotoprotectora y antioxidante de *Yucca periculosa* Baker. Tesis, Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM.
- ✦ García E. (2012). Evaluación del potencial antigenotóxico del resveratrol en co-tratamiento con MMS, en el bioensayo SMART en ala de *Drosophila melanogaster* (Cruza Estándar). Tesis, Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM.
- ✦ Gómez S. (2013). Evaluación del efecto genotóxico del resveratrol en la prueba de mutación y recombinación somáticas en ala de *Drosophila melanogaster* cruza estándar (CE). Tesis, Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM.
- ✦ González F. y Gelboin H. (1994). Role of Human Cytochromes P450 in the Metabolic Activation of Chemical Carcinogens and Toxins. *Drug Metab. Rev.* **26**: 165-183.
- ✦ González J. (2002). Evolución comparada de los elementos cromosómicos en el género *Drosophila*. Tesis. Universidad Autónoma de Barcelona.
- ✦ Graf U. (1986). Temperature effect on mwh expression in the wings somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Drosophila Information Service*. **63**: 65.

- ✦ Graf U. y Schaik N. (1992). Improved high bioactivation cross for the wing somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Mutation Research*. **271**: 59-67
  
- ✦ Graf U. y Singer D. (1992). Genotoxicity testing of promutagens in the wing somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*. **8**: 15-27.
  
- ✦ Graf U., Suresh A., Guzmán J., Würgler F. (1998). Antigenotoxicity studies in *Drosophila melanogaster*. *Mutation Research*. **402**: 203-209.
  
- ✦ Graf U., Würgler F., Katz A., Frei H., Juon H., Hall C. y Kale P. (1984). Somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Environmental Mutagenesis*. **6(2)**:153-188.
  
- ✦ Hana H., Pan Q., Zhang B., Li J., Denga X., Lian Z. y Li N. (2007). 4-NQO induces apoptosis via p53-dependent mitochondrial signaling pathway. *Toxicology*. **230**: 151-163.
  
- ✦ Held P. An Introduction to Reactive Oxygen Species. [En línea. Consulta: Enero, 2014]. Disponible en: [http://www.biotek.com/assets/tech\\_resources/ROS\\_White\\_Paper.pdf](http://www.biotek.com/assets/tech_resources/ROS_White_Paper.pdf).
  
- ✦ Heres M., Dueñas I., Castañeda L., Santos L., Vega V., Rebollar R., Gómez J. y Durán A. (2009). Genotoxicity studies of organically grown broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica*) and its interactions with urethane, methyl methanesulfonate and 4-nitroquinoline-1-oxide genotoxicity in the wing spot test of *Drosophila Melanogaster*. *Food and Chemical toxicology*.
  
- ✦ Hadi S., Ullah M., Azmi A., Ahmad A., Shamim U., Zubair H. y Khan H. (2010). Resveratrol mobilizes endogenous copper in human peripheral lymphocytes leading to oxidative DNA breakage: a putative mechanism for chemoprevention of cancer. *Pharmaceutical Research*. **27(6)**:979-988.
  
- ✦ Hengstler J., Bogdanffy M., Bolt H., y Oesch F. (2003). Challenging dogma: thresholds for genotoxic carcinogens? The case of vinyl acetate. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. **43**:485-520.

- ✦ Hozumi M. (1969). Production of hydrogen peroxide by 4-hydroxylaminoquinoline-1-oxide. *Gann*. **60**: 83-90.
- ✦ Hrazdina G., Parsons G. y Mattick L. (1984). Physiological and biochemical events during development and maturation of grape berries. *American Journal of Enology and Viticulture*. **35**:220-227
- ✦ Ide F., Oda H., Nakatsuru Y., Kusama K., Sakashita H., Tanaka K. y Ishikawa T. (2001). Xeroderma pigmentosum group A gene action as a protection factor against 4-nitroquinoline 1-oxide-induced tongue carcinogenesis. *Carcinogenesis*. **22**:567–572
- ✦ Idle J. y Gonzalez F. (2007). Metabolomics. *Cell Metab*. **6(5)**: 348-351.
- ✦ Ikenaga M., Ichikawa-Ryo H. y Kondo S. (1975a). The major cause of inactivation and mutation by 4-Nitroquinoline 1-Oxide in *Escherichia coli*: Excisable 4NQO-purine adduct. *Journal of Molecular Biology*. **92**: 341-356.
- ✦ Ikenaga M., Ishii Y., Tada M., Kakunaga T. y Takebe H. (1975b). Excision-repair of 4-nitroquinolin-1-oxide damage responsible for killing, mutation, and cancer. *Basic Life Science*. **5B**:763–771.
- ✦ Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI). (2013). Estadísticas a propósito del día mundial contra el cáncer. [En línea. Consulta: Julio, 2013]. Disponible en: <http://www.inegi.org.mx/inegi/contenidos/espanol/prensa/contenidos/estadisticas/2011/cancer11.asp?c=2781&ep=51>.
- ✦ Ishizawa M. y Endo H. (1967). On the mode of action of a potent carcinogen. 4-hydroxylaminoquinoline-1 -oxide on bacteriophage T4. *Biochemistry Pharmacology*. **16**: 637-646.
- ✦ Jeandet P., Douillet-Breuil A., Bessis R., Debord S., Sbaghi M. y Adrian M. (2002). Phytoalexins from the Vitaceae: Biosynthesis, Phytoalexin Gene Expression in Transgenic Plants, Antifungal Activity, and Metabolism. *Agricultural and Food Chemistry*. **50(10)**: 2731-2741.
- ✦ Jemal A., Bray F., Center M. Ferlay J., Ward E. y Forman D. (2011). Global cancer statistics. *Cancer Journal for Clinicians*. **61**: 69-90.

- ✦ Kaldas M., Walle K. y Walle T. (2010). Resveratrol transport and metabolism by human intestinal Caco-2 cells. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. **55(3)**: 307-312.
- ✦ Kanojia D. y Vaidya M. (2006). 4-Nitroquinoline-1-oxide induced experimental oral carcinogenesis. *Oral Oncology*. **42(7)**:655-667.
- ✦ Kim M., Glazer C. y Mambo E. (2006) Head and neck cancer cell lines exhibit differential mitochondrial repair deficiency in response to 4NQO. *Oral Oncology*. **42**:201–207.
- ✦ Kitano M. (2000). Host genes controlling the susceptibility and resistance to squamous cell carcinoma of the tongue in a rat model. *Pathology International*. **50(5)**:353-362.
- ✦ Kohda K., Kawazoe Y., Minoura Y. y Tada M. (1991). Separation and identification of N4-(guanosin-7-yl)-4-aminoquinoline 1-oxide, a novel nucleic acid adduct of carcinogen 4-nitroquinoline 1-oxide. *Carcinogenesis*. **12(8)**:1523-1525.
- ✦ Kondo S. and Kato T. (1968). Photoreactivation of mutation and killing in *Escherichia coli*. *Advances in Biological and Medical Physics*. **12**: 283-298.
- ✦ Kuhnle G., Spencer J., Chowrimootoo G., Schroeter H., Debnam E., Srai K., Rice-Evans C. y Hahn U. (2000). Resveratrol is absorbed in the small intestine as resveratrol glucuronide. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. **272**: 212-217.
- ✦ Kunwar A. y Priyadarsini K. (2011). Free radicals, oxidative stress and importance of antioxidants in human health. *Journal of Medical and Allied Sciences*. **1(2)**: 53-60.
- ✦ Learmonth D. (2003). A concise synthesis of the 3-O-β-d- and 4'-O-β-d-glucuronide conjugates of trans-resveratrol. *Bioconjugate Chemistry*. **14(1)**: 262-267.
- ✦ LeBlanc G. y Surprenant D.(1983). The acute and chronic toxicity of acetone, dimethyl formamide and triethylene glycol to *Daphnia magna* (Straus). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. **12**:305-310.
- ✦ Lucas. (2009). Estudio de la complejación del resveratrol por diferentes tipos de ciclodexinas. Tesis. Facultad de Ciencias de la Salud, de la Actividad Física y del Deporte, UCAM.

- ✦ Malcolm A. (2001). Cancer. *Nature Publishing Group*. cancer. ENCYCLOPEDIA OF LIFE SCIENCES / & 2001 Nature Publishing Group / [www.els.net](http://www.els.net). 1-8.
- ✦ Marier J., Vachon P., Gritsas A., Zhang J., Moreau J. y Ducharme M. (2002). Metabolism and disposition of resveratrol in rats: extent of absorption, glucuronidation, and enterohepatic recirculation evidenced by a linked-rat model. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. **302(1)**. 369-373.
- ✦ Martínez I. (2000). Quimioprevención del cáncer. *Revista Cubana de Oncología*. **16(1)**: 67.
- ✦ Martins J. y Vasconcelos V. (2009). Microcystin dynamics in aquatic organisms. *Journal of Toxicology and Environmental Health. Part B*. **12**: 65-82.
- ✦ Matsuoka A., Furuta A., Ozaki M., Fukuhara K. y Miyata N. (2001). Resveratrol, a naturally occurring polyphenol, induces sister chromatid exchanges in a Chinese hamster lung (CHL) cell line. *Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. **494**: 107-113.
- ✦ Mayor R. (2010). Estrés oxidativo y sistema de defensa antioxidante. Servicio de Pediatría del Instituto de Medicina Tropical. **5(2)**: 23-29.
- ✦ McClure K., French R. y Heberlein U.. (2011). Fetal alcohol syndrome disorders: role for the insulin pathway. *Disease Models and Mechanisms*. **4**: 335-346.
- ✦ Mei N., Lee J., Sun X., Xing J., Hanson J., Le X. y Weinfeld M. (2003). Genetic predisposition to the cytotoxicity of arsenic: the role of DNA damage and ATM. *FASEB Journal*. **17**: 2310–2312.
- ✦ Meira L., Coelho B., Behr G., Pettenuzzo L., Souza I., Moreira J., Borojevic R., Gottfried C. y Costa F. (2013). Resveratrol induces pro-oxidant effects and time-dependent resistance to cytotoxicity in activated hepatic stellate cells. *Cell Biochemistry Biophys*.
- ✦ Merrick B. (2006). Toxicoproteomics in liver injury and inflammation. *Annals of the New York Academy of Sciences*. **1076**: 701-717.
- ✦ Mitrut P., Burada F., Enescu A., Scorei R., Badea D., Genunche-Dumitrescu A., Rogoz I. y Manea M. (2009). The genotoxicity study of resveratrol in primary gastric

adenocarcinoma cell cultures. *Romanian Journal of Morphology and Embryology*. **50(3)**:429–433.

- ✦ Mollet P. y Würigler F. (1974). Detection of somatic recombination and mutation in *Drosophila*. A method for testing genetic activity of chemical compounds. *Mutation Research*. **25(3)**: 421- 424.
- ✦ Nagao M. y Sugimura T. (1976). Molecular biology of the carcinogen, 4-nitroquinoline 1-oxide. *Advances in Cancer Research*. **23**:131-169.
- ✦ Negishi M., Pedersen L., Petrotchenko E., Shevtsov S., Gorokhov A., Kakuta Y. y Pedersen L. (2001). Structure and function of sulfotransferases. *Archives Biochemistry and Biophysics*. **390(2)**: 149-157.
- ✦ Nunoshiba T. y Demple B. (1993). Potent intracellular oxidative stress exerted by the carcinogen 4-nitroquinoline-N-oxide. *Cancer Research*. **53(14)**:3250-3252.
- ✦ Obe G. y Anderson D. (1987). International Commission for Protection against Environmental Mutagens and Carcinogens. ICPEMC Working Paper No. 15/1. Genetic effects of ethanol. *Mutatant Research*. **186**: 177-200.
- ✦ Ogawab H. y Nakaoa A. (2008). A possible link between resveratrol and TGF- $\beta$ : Resveratrol induction of TGF- $\beta$  expression and signaling. *FEBS Letters*. **582**: 586-590.
- ✦ Organización Mundial de la Salud (OMS). Cáncer. [En línea. Consulta: Julio, 2013]. Disponible en: <http://www.who.int/cancer/es/index.html>.
- ✦ Osaba L., Aguirre A., Alonso A. y Graf U. (1999). Genotoxicity testing of six insecticides in two crosses of the *Drosophila* wing spot test. *Mutation Research*. **439**: 49-61.
- ✦ Pace D. y Elliott A. (1962). Effects of acetone and phenol on established cell lines cultivated *in vitro*. *Cancer Research*. **22**:107-112
- ✦ Percival M. (1998). Antioxidants. *Advanced Nutrition Publications*.
- ✦ Reiter L., Potocki L., Chien S., Gribskov M. y Bier E. (2001). A systematic analysis of human disease-associated gene sequences in *Drosophila melanogaster*. *Genome Research*. **11(6)**: 1114- 1125.

- ✦ Ruíz M y Cano M. (2013). Eliminación de fármacos. En: Fernández M y Ruíz M. Fundamentos de Farmacología Básica y Clínica. Editorial Universitaria Ramón Areces. pp. 192-198.
- ✦ Sanear A. y Sanear G. (1988). DNA repair enzymes. *Annual Review of Biochemistry*. **57**: 29-67.
- ✦ Saner C., Weibel B., Wurgler F., Sengstag C. (1996). Metabolism of promutagens catalyzed by *Drosophila melanogaster* CYP6A2 enzyme in *Saccharomyces cerevisiae*. *Environmental and Molecular Mutagenesis*. **27**: 46-58.
- ✦ Sang S., Yang I., Buckley B., Ho C. y Yanga C. (2007). Autoxidative quinone formation in vitro and metabolite formation in vivo from tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate: studied by real-time mass spectrometry combined with tandem mass ion mapping. *Free Radical Biology and Medicine*. **43(3)**: 362-371.
- ✦ Sato M., Maulik G., Bagchi D. y Das D. (2000). Myocardial protection by protykin, a novel extract of trans-resveratrol and emodin. *Free Radical Research*. **32(2)**: 135-144.
- ✦ Schmitt E., Lehmann L., Metzler M. y Stopper H. (2002). Hormonal and genotoxic activity of resveratrol. *Toxicology Letters*. **136**: 133-142.
- ✦ Secretaría de Salud. (2013). Los 5 tipos de cáncer que más afectan a los mexicanos. [En línea. Consulta: Junio, 2013], Disponible en: <http://www.spps.gob.mx/noticias/1445-5-tipos-cancer-mas-afectan-mexicanos.html>.
- ✦ Shakibaei M., Harikumar K. y Aggarwal B. (2009). Resveratrol addiction: To die or not to die. *Molecular Nutrition and Food Research*. **53**:115-128.
- ✦ Signorelli P. y Ghidoni R. (2005). Resveratrol as an anticancer nutrient: molecular basis, open questions and promises. *Journal of Nutritional Biochemistry*. **16**: 449-466.
- ✦ Silva J. (2013). Efecto modulador del resveratrol contra el promutágeno uretano con SMART en ala de *Drosophila melanogaster*, cruza estándar (CE). Tesis, Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM.

- ✦ Snyderwine E. y Bohr V. (1992). Gene and strand specific Damage and repair in chinese hamster ovary cells treated with 4-Nitroquinoline 1-Oxide. *Cancer Research*. **52**:4183-4189.
- ✦ Soleas G., Angelini M., Grass L., Diamandis E. y Goldberg D. (2001). Absorption of trans-resveratrol in rats. *Methods in Enzymology*. **335**:145-54.
- ✦ Soleas G., Diamandis E. y Goldberg D. (1997). Resveratrol: A molecule whose time has come? And gone? *Clinical Biochemistry*. **30(2)**: 91-113.
- ✦ Soleas G., Yan J., Goldberg D.. (2001). Measurement of trans-resveratrol, (+)-catechin, and quercetin in rat and human blood and urine by gas chromatography with mass selective detection. *Methods in Enzymology*. **335**: 130-145.
- ✦ Suenaga F., Hatsushika K., Takano S., Ando T., Ohnuma Y., Ogawa H. y Nakao A. (2008). A possible link between resveratrol and TGF- $\beta$ : Resveratrol induction of TGF- $\beta$  expression and signaling. *FEBS Letters*. **582**: 586-590.
- ✦ Sugimura T., Otake H. y Matsushima T. (1968). Single strand scissions of DNA caused by a carcinogen, 4-hydroxylamino-quinoline-I -oxide. *Nature*. **218**: 392-393.
- ✦ Szabad J. and Bryant P. (1982). The mode of action of “discless” mutations in *Drosophila melanogaster*. *Development Biology*. **93**: 240-256.
- ✦ Tada M. y Tada M. (1975). Seryl-tRNA synthetase and activation of the carcinogen 4-nitroquinoline 1-oxide. *Nature*. **255**:510-512.
- ✦ Trela B. y Waterhouse A. (1996). Resveratrol: Isomeric molar absorptivities and stability. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **44(5)**: 1253-1257.
- ✦ Tsao R. (2010). Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. *Nutrients*. **2**: 1231-1246.
- ✦ Urpi M., Zamora R., Lamuela R., Cherubini A., Jauregui O., de la Torre R., Covas M., Estruch R., Jaeger W., Andres C. (2007). HPLC-tandem mass spectrometric method to characterize resveratrol metabolism in humans. *Clinical Chemistry*. **53(2)**: 292-299.

- ✦ Valko M., Rhodes C., Moncola J., Izakovic M. and Mazura M. (2006). Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions*. **160**:1-40.
- ✦ Vitale-Cross L., Czerninski R., Amornphimoltham P., Patel V., Molinolo A. y Gutkind S. (2009). Chemical carcinogenesis models for evaluating molecular-targeted prevention and treatment of oral cancer. *Cancer Prevention Research*. **2**:419-422.
- ✦ Vitrac X., Desmoulièreb A., Brouillaudc B., Krisaa S., Deffieuxa G., Barthech N., Rosenbaumb J. y Mérillon J. (2003). Distribution of [14C]-*trans*-resveratrol, a cancer chemopreventive polyphenol, in mouse tissues after oral administration. *Life Sciences*. **72(20)**: 2219-2233.
- ✦ Walle T. (2011). Bioavailability of resveratrol. *Annals of the New York Academy of Sciences*. **1215**: 9-15.
- ✦ Walle T., Hsieh F., DeLegge M., Oatis J. y Walle K. (2004). High absorption but very low bioavailability of oral resveratrol in humans. *Drug Metabolism and Disposition*. **32(12)**: 1377–1382.
- ✦ Wilkey J., Buchberger G., Saucier K., Patel S., Eisenberg E., Nakagawa H., Michaylira C., Rustgi A. y Mallya S. (2009). Cyclin D1 overexpression increases susceptibility to 4-nitroquinoline-1-oxide-induced dysplasia and neoplasia in murine squamous oral epithelium. *Molecular Carcinogenesis*. **48(9)**:853-61.
- ✦ Winkle S. and Tinoco I. Jr. (1978). Interactions of 4-nitroquinoline 1-oxide with four deoxyribonucleotides. *Biochemistry*. **17(17)**: 1352-1356.
- ✦ Winterbourn C. (2008). Reconciling the chemistry and biology of reactive oxygen species. *Nature Chemical Biology*. **4**: 278-286.
- ✦ Wolper L., Beddington R., Brockes J., Jessell T., Lawrence P. y Meyerowitz E. (1998). Principles of Development. *Oxford University Press*.
- ✦ Woutersen R., Appelman L., Van G. and Feron, V. (1986). Inhalation toxicity of acetaldehyde in rats. III. Carcinogenicity study. *Toxicology*. **41**: 213-231.

- ✦ Yang J., McCart C., Woods D., Terhzaz S., Greenwood K., Ffrench-Constant R. y Dow J. (2007). A Drosophila systems approach to xenobiotic metabolism. *Physiological Genomics*. **30(3)**: 223-231.
- ✦ Yoshikawa T. y Naito Yuji. (2002). What Is Oxidative Stress?. *Journal of the Japan Medical Association*. **45(7)**: 271–276.
- ✦ Zheng L., Wei Q., Cai Y., Fang J., Zhou B., Yang L. y Liu Z. (2006). DNA damage induced by resveratrol and its synthetic analogues in the presence of Cu (II) ions: Mechanism and structure-activity relationship. *Free Radical Biology & Medicine*. **41**: 1807-1816.

## **ANEXO I**

### **Metabolismo xenobiótico**

Xenobiótico es un término usado para sustancias químicas extrañas para el cuerpo. Esto incluye, por ejemplo, componentes de las plantas, medicamentos, pesticidas, fragancias, aditivos alimenticios, químicos industriales y contaminantes del medio ambiente. Se ha estimado que los humanos se exponen de 1 a 3 millones de xenobióticos a lo largo de su vida (Idle y González, 2007). La mayoría de estos productos químicos acceden al cuerpo a través de la dieta, el aire, el agua y administración de fármacos (Martins y Vasconcelos, 2009).

Ante la exposición a xenobióticos el hígado juega un papel central, ya que previene la acumulación de una amplia gama de compuestos, convirtiéndolos en moléculas más polares, incrementando su solubilidad para después ser excretadas. El metabolismo de xenobióticos requiere múltiples transformaciones bioquímicas, lo que puede alterar su acción y distribución llevando a su desintoxicación y excreción o aumentando su toxicidad debido a la activación del compuesto (Merrick, 2006).

La biotransformación de xenobióticos usualmente ocurre en dos fases: Fase I que tiene lugar principalmente en el retículo endoplásmico liso. Aquí se presentan reacciones de funcionalización que conducen a compuestos más reactivos y Fase II que tienen lugar en el citosol, son reacciones de conjugación que conducen a sustancias más polares y más fácilmente excretables. En general, en Fase II el sustrato es un metabolito procedente de la Fase I, aunque algunos fármacos pueden presentar directamente una reacción de conjugación sin necesidad de pasar por Fase I (Ruíz y Cano, 2013).

### **Reacciones de Fase I**

Estas pueden ser de tres tipos de reacciones: de oxidación, reducción e hidrólisis. Las reacciones más frecuentes son las de oxidación y junto con las de reducción son llevadas a

cabo por un sistema enzimático, conocido como sistema de mono oxigenasas del citocromo P450 (Ruíz y Cano, 2013).

Las reacciones de hidrólisis las llevan a cabo enzimas que actúan de manera inespecífica, que incluyen esterases, amidasas y proteasas (Ruíz y Cano, 2013).

## **Citocromos P450**

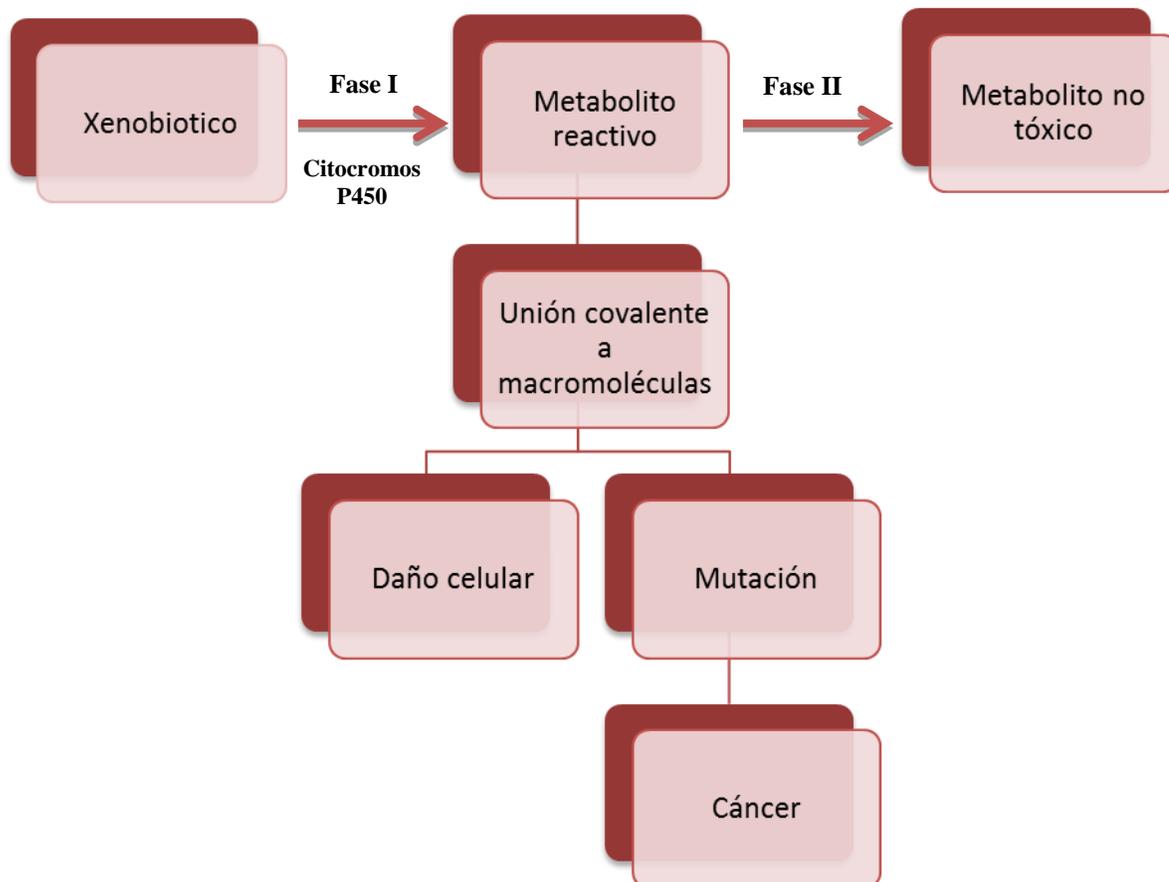
Citocromos P450 (CYPs) engloba una superfamilia de enzimas que tienen la característica común de ser hemoproteínas que, en su forma reducida pueden formar complejos con el monóxido de carbono. En estas condiciones, estos complejos presentan un máximo de absorción en el espectro ultravioleta/visible a 450 nm, que es lo que da el nombre al sistema. Estas enzimas oxidan una enorme variedad de sustratos que incluyen sustancias endógenas, fármacos, contaminantes ambientales y otros xenobióticos. Los CYP450s catalizan reacciones de reducción en condiciones de baja tensión de oxígeno (Ruíz y Cano, 2013).

En vertebrados las enzimas de este sistema se localizan principalmente en hepatocitos. En *Drosophila melanogaster* se producen principalmente en el tejido graso, el intestino medio y los túbulos de Malpighi (Yang *et al.*, 2007). Estas enzimas tienen un átomo de hierro (Fe II o Fe III) en el grupo prostético hemo; la forma oxidada de Fe III se une al xenobiótico, y el complejo resultante acepta electrones del NADPH, proceso catalizado por una NADPH CYP450 reductasa; como resultado, el Fe III se reduce a Fe II y el xenobiótico se oxida (Ruíz y Cano, 2013). Estos citocromos tienen la capacidad de metabolizar una amplia variedad de agentes carcinógenos (González y Gelboin, 1994).

## **Reacciones de Fase II**

Las reacciones de Fase II son reacciones de conjugación que en general tienen lugar con metabolitos procedentes de Fase I. Están catalizadas por un grupo de enzimas que reciben el nombre de transferasas (Ruíz y Cano, 2013). Las reacciones que se llevan a cabo en esta fase son glucuronidación, sulfatación, metilación, acetilación, conjugación de glutatión y

conjugación de aminoácidos. Los productos de conjugación de Fase II son típicamente más hidrofílicos que los compuestos parentales y por lo tanto más fácilmente excretables (Negishi *et al.*, 2001).



**Figura 7.** Vías del metabolismo xenobiótico y sus efectos.

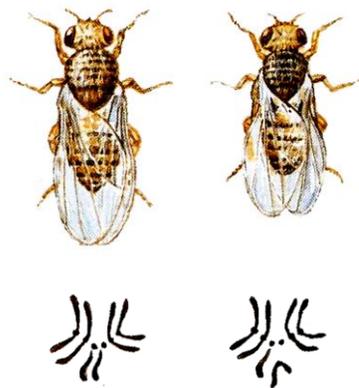
## ANEXO II

### *Drosophila melanogaster*

La mosca de la futa, *Drosophila melanogaster*, es un organismo modelo en el estudio de problemas biológicos debido a que comparte aproximadamente el 77% de los genes involucrados en las enfermedades humanas (Reiter *et al.*, 2001). Las principales ventajas de este organismo se centran fundamentalmente en su tiempo de generación corto, abundante descendencia y fácil mantenimiento debido a sus reducidas dimensiones (Amorós, 2001).

De las principales características que tiene *Drosophila*, es que en estado larval presentan cromosomas politénicos en las células de las glándulas salivales, que son cromosomas interfásicos que sufren ciclos de replicación donde los homólogos se unen y las copias de DNA se organizan de manera continua formando un único cromosoma gigante, lo cual facilita su observación microscópica y el análisis cromosómico (González, 2002).

*Drosophila melanogaster* posee solamente 4 pares de cromosomas, los cromosomas sexuales X e Y y tres pares de cromosomas autosómicos (II, III y IV). Los cromosomas Y e IV son pequeños y telocéntricos, por lo que la mayoría de los genes se localizan en los cromosomas X (I), II y III que son metacéntricos y grandes (González, 2002).



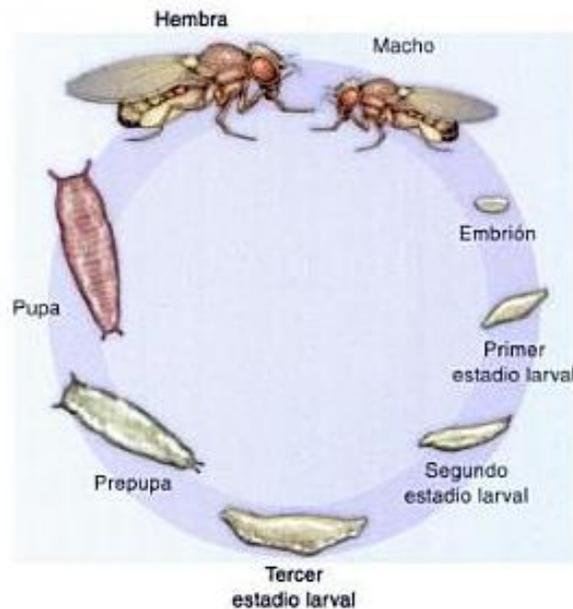
**Figura 8.** Cromosomas de *Drosophila melanogaster*. Hembra y macho respectivamente. (Tomado de:

<http://e-educativa.catedu.es/44700165/aula/archivos/repositorio//500/567/html/Unidad04/imagenes/133.jpg>)

## Ciclo de vida de *Drosophila melanogaster*

*Drosophila melanogaster* es un insecto holometábolo, es decir, presenta etapas larvarias y una etapa adulta separada por una etapa de pupa, durante la cual tiene lugar la metamorfosis completa, su ciclo vital es de 10 días a 25°C (Amorós, 2001).

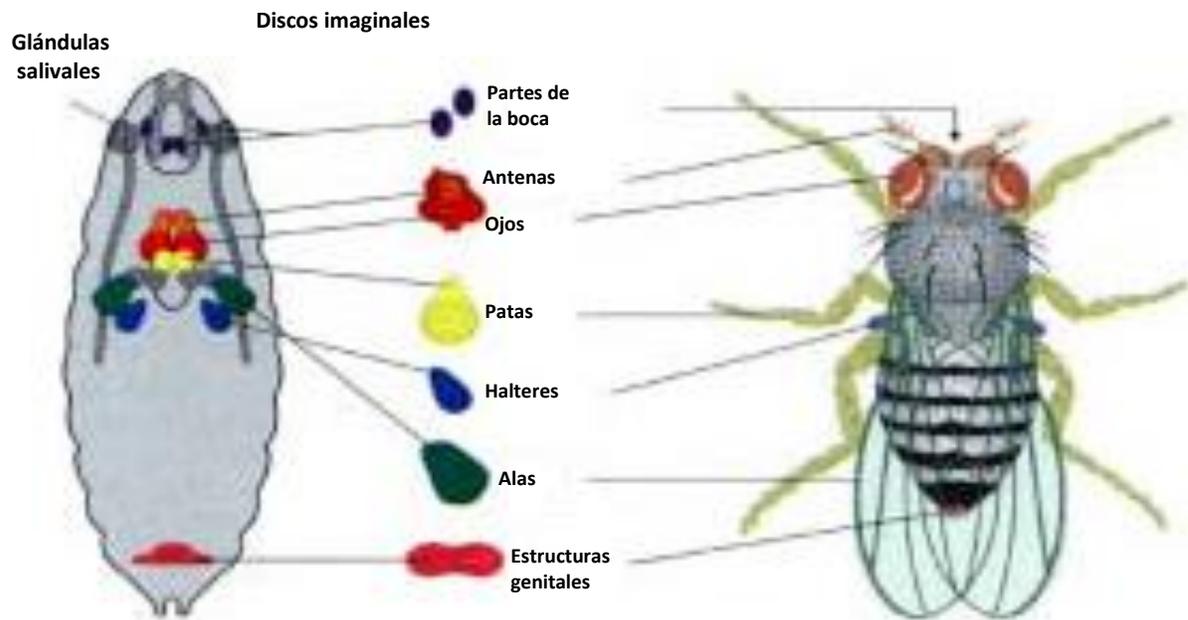
El periodo de desarrollo embrionario comienza en el momento de la fecundación que a 25°C tiene una duración aproximada de 24 h. Al cabo de este periodo, el embrión rompe la cáscara del huevo y emerge como larva. Esta larva pasa por tres estadios sucesivos, durante este periodo las células de las glándulas salivales básicamente no proliferan, sin embargo crecen de volumen debido a la endoreduplicación de su material genético. Al final del tercer estadio larval, 5 días después, la larva se convierte en pupa e inicia la metamorfosis. Durante esta etapa los tejidos larvales son degradados, mientras que las estructuras adultas se formarán principalmente a partir de la reorganización de los discos imaginales (que darán lugar a las estructuras epidérmicas de la cabeza, tórax y genitales externos del adulto) y los histoblastos (que formarán la epidermis abdominal del adulto). A las pocas horas de vida, la mosca adulta es fértil y se inicia de nuevo el ciclo vital (Amorós, 2001; Curtis *et al.*, 2008).



**Figura 9.** Ciclo de vida de *Drosophila melanogaster*. (Tomado de Curtis *et al.*, 2008).

## Discos imaginales de *Drosophila melanogaster*

Los discos imaginales son estructuras larvarias que darán lugar a los tejidos epiteliales del adulto de *Drosophila melanogaster*. Los precursores de estos discos son un conjunto de células (entre 10 y 40 dependiendo del disco imaginal), que se segregan como invaginaciones de la epidermis embrionaria y que crecen por mitosis justo hasta antes de la metamorfosis, incrementando su número de células (Bate y Martínez, 1991). Las células de los discos son histológicamente similares, pero difieren en sus patrones de expresión génica (Amorós, 2001).



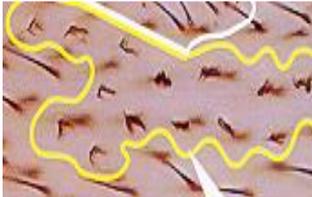
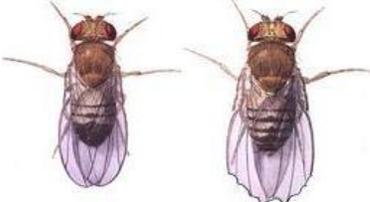
**Figura 10.** Morfología, localización y estructuras del adulto a las que dan lugar los discos imaginales de *Drosophila* (Modificado de Wolper *et al.*, 1998).

## ANEXO III

### Prueba de mutación y recombinación somática (SMART) en ala de *Drosophila melanogaster*

SMART es un ensayo *in vivo* que determina la genotoxicidad de agentes químicos mediante la pérdida de heterocigosis. Este bioensayo hace uso de dos marcadores recesivos en células de ala en modelos trans heterocigotos *mwh +/+ flr<sup>3</sup>* (Graf *et al.*, 1984).

**Tabla 8.** Marcadores expresados en ala de *Drosophila melanogaster*.

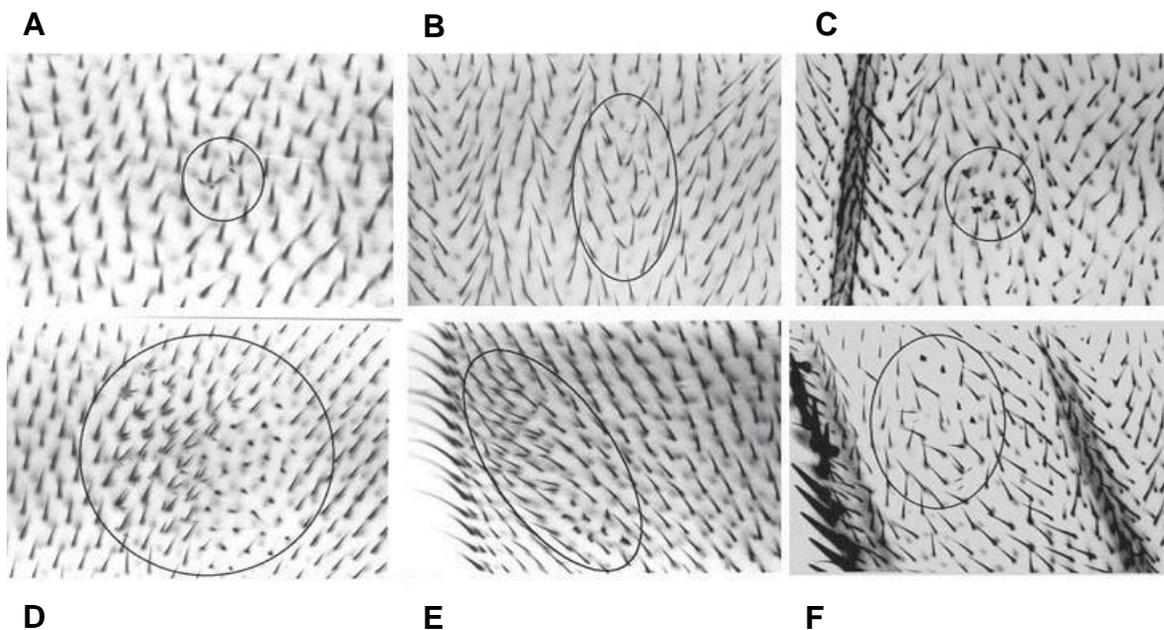
Marcador	Descripción	Imagen
<i>multiple wing hairs</i> ( <i>mwh</i> )	Es una mutación recesiva homocigota viable. Ubicado en el brazo izquierdo del cromosoma 3 (3-03). Produce múltiples tricomas por célula en lugar de un único tricoma (Graf <i>et al.</i> , 1984).	 <p><b><i>mwh</i> 3-0.3</b></p>
<i>flare</i> ( <i>flr<sup>3</sup></i> )	Es una mutación recesiva, marcador ubicado en el cromosoma 3 (3-38.8) que produce tricomas malformados que tienen forma de flama. Los alelos mutantes de <i>flr</i> son homocigotos letales. Por lo tanto la cepa <i>flr<sup>3</sup></i> presenta un cromosoma balanceador portador de múltiples inversiones y un marcador dominante que es letal en homocigosis ( <i>flr<sup>3</sup>/TM3</i> , <i>Bd<sup>5</sup></i> : Third Multiple 3, Beaded-Serrate) (Graf <i>et al.</i> , 1984).	 <p><b><i>Flr<sup>3</sup></i> 3-38.8</b></p>
Beaded-Serrate ( <i>Bd<sup>5</sup></i> )	Marcador dominante que se localiza en el brazo derecho del cromosoma 3 (3-92.5), se expresa en forma de muescas en el borde del ala y es letal en homocigosis (Osaba <i>et al.</i> , 1999).	 <p><b>Ala Silvestre      <i>Bd<sup>5</sup></i> 3-92.5</b></p>

Esta pérdida de heterociguidad produce clones simples (pequeños o grandes) por mutación puntual, deleción o por no disyunción (Graf *et al.*, 1984).

Cuando una alteración genética es inducida en una célula de los discos imagales puede dar lugar a un clon o clones de células *mwh* y/o *flr<sup>3</sup>* visibles en la superficie del ala de la mosca adulta. El número total de clones inducidos en un grupo de moscas tratadas con cierto compuesto, ofrece datos cuantitativos de la actividad genotóxica del compuesto, mientras que el tipo de clon puede revelar los mecanismos por los cuales se presentó la mutación (Baker y Smith 1979; Baker *et al.*, 1978; Szabad y Bryant, 1982).

Las manchas pequeñas (1-2 células) y grandes ( $\geq 3$  células) indican que ocurrió una mutación, en *mwh* o *flr<sup>3</sup>*, una alteración cromosómica (deleción de *mwh* o *flr<sup>3</sup>*) o recombinación somática. Por otra parte, las manchas gemelas (clon de *mwh* y *flr<sup>3</sup>* adjuntos) se derivan exclusivamente de la recombinación somática (Graf *et al.*, 1984).

Las manchas pequeñas se producen durante las dos últimas divisiones en la pupa, mientras las manchas grandes se producen antes, durante la alimentación de la larva. Las mutaciones espontáneas, frecuentemente resultan sólo en pequeños clones, independientemente del momento de iniciación (Graf *et al.*, 1984).



**Figura 11.** Diferentes tipos de clones y sus variaciones: **A)** Mancha pequeña con 2 células expresando el fenotipo *mwh*; **B)** Mancha grande con 5 células expresando el fenotipo *mwh*; **C)**

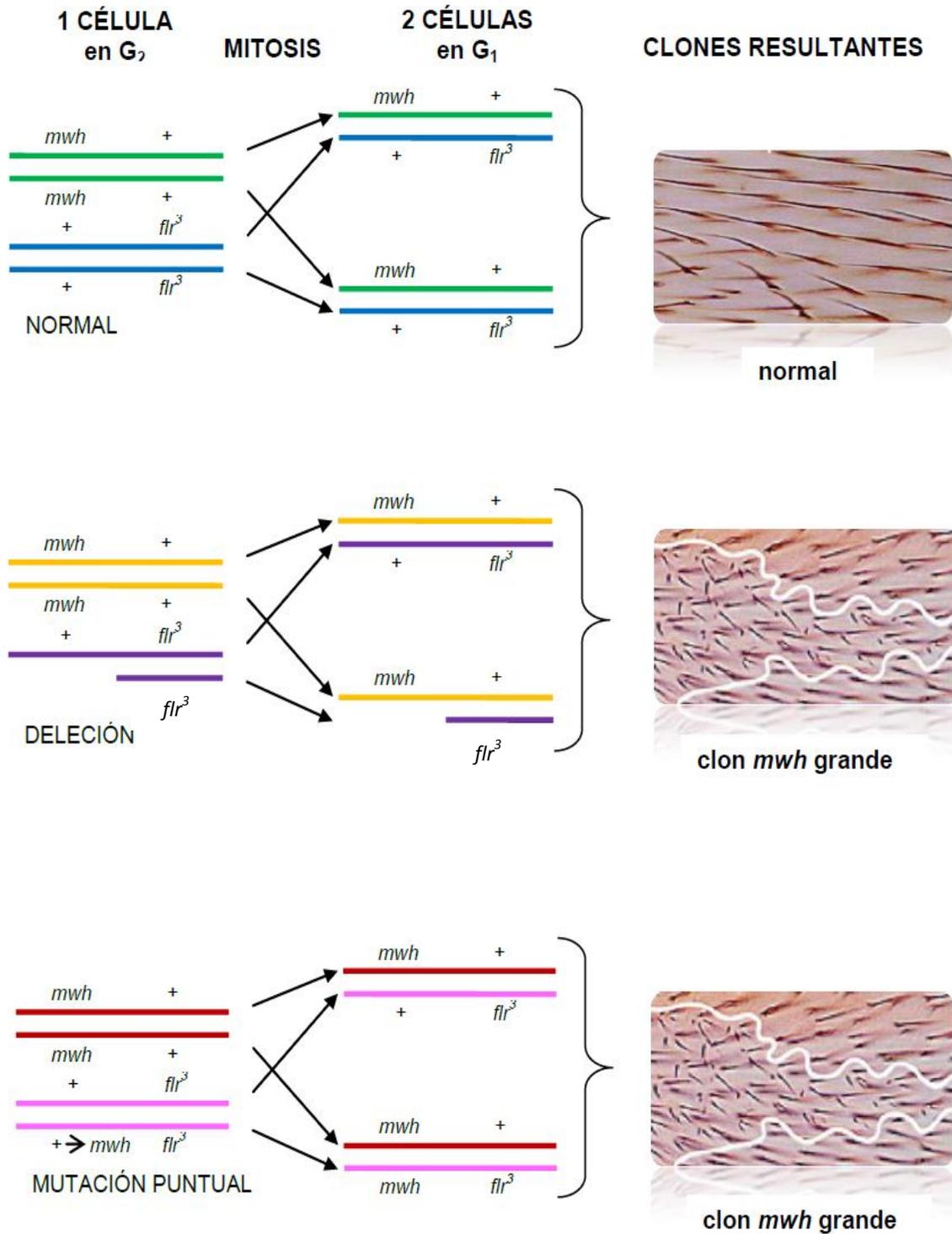
Mancha grande con 6 células expresando el fenotipo *flr<sup>3</sup>*; **D)** Mancha gemela con 30 células expresando el fenotipo *mwh* y 30 células expresando el fenotipo *flr<sup>3</sup>*; **E)** Mancha gemela con 14 células expresando el fenotipo *mwh* y 8 células expresando el fenotipo *flr<sup>3</sup>*; **F)** Mancha gemela con 4 células expresando el fenotipo *mwh* y 4 células expresando el fenotipo *flr<sup>3</sup>*. (Modificado de De Andrade *et al.*, 2004).

Este ensayo usualmente utiliza la cruce estándar (CE) con niveles regulados de citocromos P450, donde hembras vírgenes flare son colectadas y cruzadas con machos multiple wing hair (Graf y Singer, 1992). Sin embargo, con el objetivo de mejorar el rendimiento en la prueba, en el caso de los promutágenos activados a través de los citocromo P450 Frölich y Würgler en 1989 construyeron una nueva cepa portadora de los cromosomas 1 y 2 de la línea Oregon R (R) resistente a DDT, la cual está caracterizada por su alto nivel de citocromos P450 (Saner *et al.*, 1996). Un gran número de promutágenos muestran un incremento en la genotoxicidad cuando es empleada la cruce de bioactivación elevada (CBE) (hembras ORR/ORR; *flr<sup>3</sup>*/TM3, *Bd<sup>s</sup>* y machos *mwh*) (Graf y Singer, 1992; Graf y Schaik, 1992).

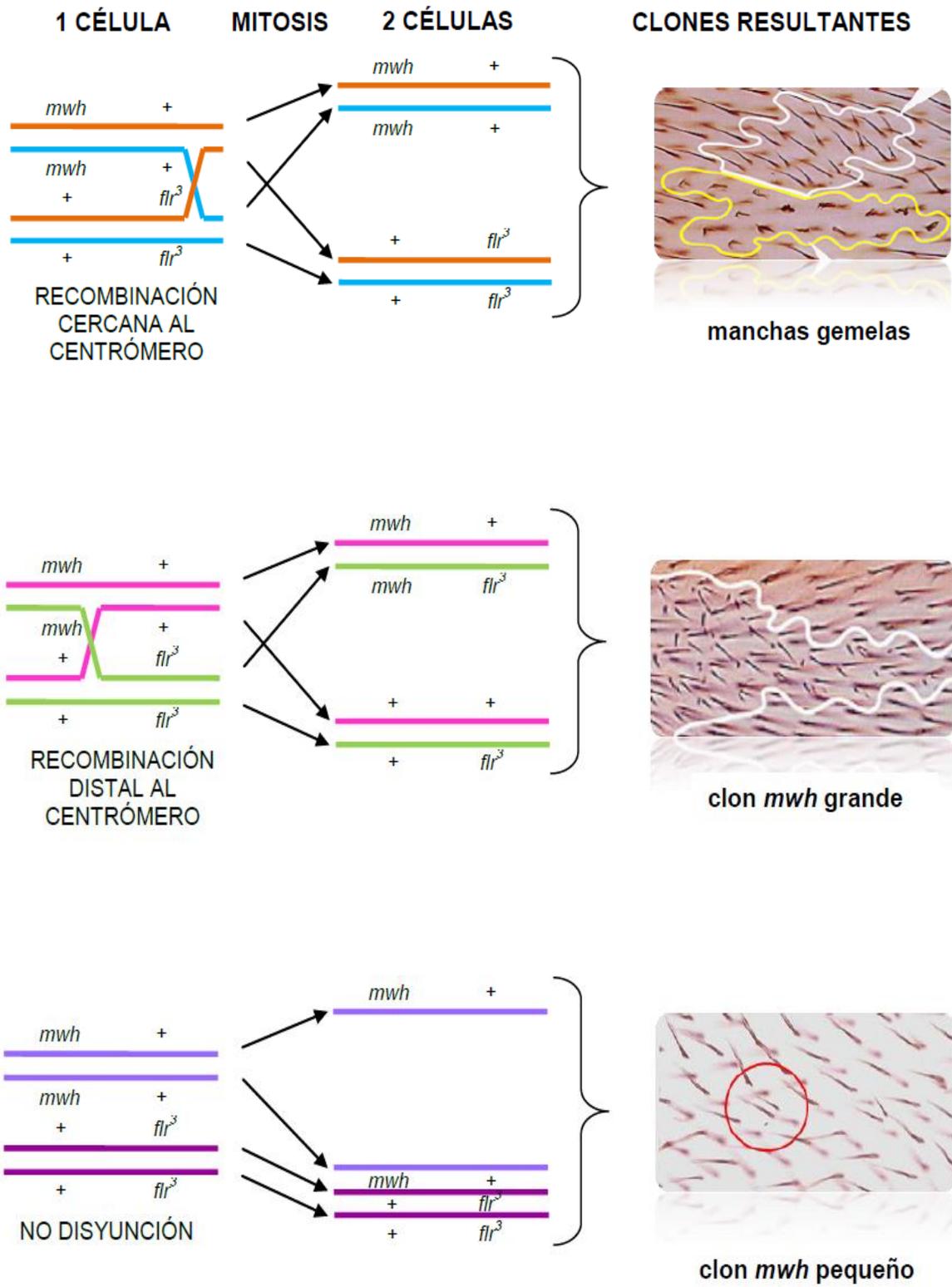
### **Pérdida de heterocigosis**

Ciertos eventos mutagénicos pueden llevar a la pérdida del alelo dominante (silvestre) opuesto al marcador, con la subsecuente expresión del alelo recesivo (marcador) en un clon de las células mutadas. La pérdida del alelo dominante puede ocurrir mediante ciertos mecanismos: recombinación somática entre cromátidas no hermanas, esperando una mancha gemela si la recombinación ocurre entre *flr<sup>3</sup>* y el centrómero, por otra parte, el evento de recombinación entre *mwh* y *flr<sup>3</sup>* puede resultar una mancha *mwh* simple (Graf *et al.*, 1894; Mollet y Würgler, 1974).

Las manchas simples pueden deberse también a la delección de un segmento del brazo izquierdo del cromosoma que involucra el alelo silvestre, o a la no disyunción, otro mecanismo donde se pierde el cromosoma portador del alelo silvestre (Graf *et al.*, 1984).



**Figura 12 a.** Eventos genéticos que ocasionan la pérdida de heterocigosis de los marcadores *flr<sup>3</sup>* y *mwh* y su consiguiente expresión fenotípica.



**Figura 12 b.** Eventos genéticos que ocasionan la pérdida de heterocigosis de los marcadores *flr<sup>3</sup>* y *mwh* y su consiguiente expresión fenotípica.