

**UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRES
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACEUTICAS Y BIOQUIMICAS
CARRERA DE QUIMICA FARMACEUTICA
LABORATORIO DE FARMACOLOGIA**



TESIS DE GRADO

**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD GENOTÓXICA DE CICLOFOSFAMIDA Y
MITOMICINA C MEDIADA POR SU BIOTRANSFORMACIÓN EMPLEANDO EL
TEST DE MUTACION Y RECOMBINACION SOMATICA: SMART**

POSTULANTE: Mónica Paula Gonzales Hyzy

ASESORES: Dr. Eduardo Gonzales PhD.
Lic. Araceli Pillco Msc.

**Laboratorio de Farmacologia
Universidad Mayor de San Andres**

La Paz – Bolivia

2006

**UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACEUTICAS Y BIOQUIMICAS
CARRERA DE QUIMICA FARMACEUTICA
LABORATORIO DE FARMACOLOGIA**



**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD GENOTÓXICA DE CICLOFOSFAMIDA Y
MITOMICINA C MEDIADA POR SU BIOTRANSFORMACIÓN EMPLEANDO EL
TEST DE MUTACION Y RECOMBINACION SOMATICA: SMART**

POSTULANTE: Mónica Paula Gonzales Hyzy

**TESIS DE GRADO PARA OPTAR EL TITULO DE LICENCIATURA EN
QUIMICA FARMACEUTICA**

La Paz – Bolivia

2006

Dedicatoria

A la vida por darme la oportunidad de disfrutar de su belleza y de juzgar entre el bien y el mal.

A mis amados padres Halina y Benjamín quienes cultivaron en mí, la perseverancia, el cariño y el respeto.

Al Dr. Eduardo Gonzales por su gran ayuda y la fe que puso en mí, encaminando mi destino al mundo de la ciencia.

Y uno muy especial a la Lic. Araceli Pillco, quien no solo me llenó de conocimientos, sino que también me dio su valiosa amistad.

AGRADECIMIENTOS:

- ❖ *Agradezco de todo corazón a mis asesores Dr. Eduardo Gonzales y Lic. Araceli Pillco por todo su apoyo y confianza durante la realización de este trabajo.*
- ❖ *A mis padres por su interés y preocupación en mi desarrollo como estudiante y como persona.*
- ❖ *A mis amigas Pseidy Mamani y Angela Marca por darme fuerzas en momentos de desconcierto.*
- ❖ *A alguien muy especial, Mauricio Ferrufino por darme el empujoncito de todos los días y confiar en mi habilidad.*
- ❖ *A mi mejor amigo Oscar Uberhuaga por haberme apoyado y creído siempre en mi.*
- ❖ *A todos los docentes de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas por haberme acogido durante mi desenvolvimiento académico, por toda su enseñanza y apoyo.*

RESUMEN

La prueba *in vivo* de Mutación y Recombinación Somática que emplea a *Drosophila melanogaster* como organismo experimental ha sido empleada para determinar la actividad recombinogénica y mutagénica que poseen los medicamentos anticancerígenos Mitomicina C (MMC) y Ciclofosfamida (CPH) con relación a su biotransformación a través de la enzima citocromo p-450. Para este fin, se emplearon dos diferentes tipos de cruces con los marcadores genéticos *flr*³ y *mwh*: El cruce Estándar y el cruce de Alta Bioactivación. El cruce de HB debido a que posee niveles elevados de la enzima citocromo P-450, presenta una mayor sensibilidad hacia los promutágenos y procarcinógenos. Larvas de tercer estadio procedentes de ambos cruces fueron tratadas con 0.025 y 0.05mM de MMC, 1 y 2mM de CPH y agua destilada como control negativo. De ambos cruces, se obtuvieron dos tipos de progenie: Transheterocigotos y heterocigotos. Las alas de ambos genotipos fueron analizadas en busca de Manchas Simples Pequeñas, Manchas Simples Grandes y Manchas Gemelas que expresen el fenotipo *mwh* y/o *flr*³. En el genotipo Transheterocigoto, las manchas pueden deberse a recombinación mitótica o a mutación génica ó cromosómica, en cambio las manchas en el fenotipo heterocigoto solo pueden deberse a mutación génica o cromosómica. Los resultados obtenidos han demostrado que tanto MMC como CPH son agentes genotóxicos y carcinógenos puesto que fueron capaces de producir mutación genética y recombinogénica, observándose mayor actividad en MMC, especialmente en el Cruce Estándar, lo que podría deberse a una activación directa. Por otro lado la actividad de CPH fue mayor en el Cruce Alta Bioactivación, lo que confirma la existencia de un proceso de biotransformación mediante el enzima citocromo p-450.

SUMMARY

The *in vivo* assay of Somatic Mutation and Recombination Test that uses *Drosophila melanogaster* as experimental organism, was used to determine the recombinogenic and mutagenic activity of the anticancer drugs Mitomycin C (MMC) and Cyclophosphamide (CPH) related to their biotransformation through the enzyme cytochrome-P450. Two different crosses involving the wing cell markers *flr*³ and *mwh* were used: The Standard cross and the High Bioactivation cross. The HB, characterized by a high constitutive level of cytochromes P-450, has an increased sensitivity to a number of promutagens and procarcinogens. Three-day old larvae derived from both crosses were treated with 0.025 and 0.05mM of MMC, 1 and 2mM of CPH and distilled water as negative control. From both crosses two types of progeny were obtained: marker-heterozygous and balancer-heterozygous. The wings of both genotypes were analyzed for the occurrence of single and twin spots expressing the *mwh* and/or *flr*³ mutant phenotypes. In the marker-heterozygous genotype the spots can be due either to mitotic recombination or to mutation, but in the balancer-heterozygous genotype it can be only due to mutation. The results obtained had demonstrated that not only MMC but also CPH are genotoxic and cacinogenic agents because both drugs had led to genetic and recombinogenic mutations although, MMC had showed a higher genotoxic activity, specially for the St cross which was probably because of an direct activation. On the other hand, the activity of CPH was higher in the HB cross which confirm its bioactivation by the cytochrome P-450.

INDICE DE CONTENIDO	Pág.
I. INTRODUCCION	1
II. ANTECEDENTES	5
1. Citocromo P-450	5
2. Ciclofosfamida	10
2.1. Mecanismo general de acción	10
2.2. Propiedades y características farmacocinéticas	12
2.3. Reacciones Adversas	13
2.4. Aplicaciones terapéuticas	14
3. Mitomicina C	14
3.1. Mecanismo general de acción	14
3.2. Características farmacocinéticas	15
3.3. Toxicidad clínica	17
4. Test de Mutación y Recombinación Somática (SMART)	17
III OBJETIVOS	4
1. Objetivo General	4
2. Objetivos específicos	4
IV METODOLOGÍA	25
1. Obtención de la muestra	25
2. Preparación de la Muestra	26
3. Formación de Cruces Estándar y Alta Bioactivación	27
4. Aislamiento y tratamiento de larvas	27
5. Lectura de las alas	29
6. Análisis Estadístico	30
V. RESULTADOS	32
1. Evaluación de la genotoxicidad producida por MMC y CPH en el Cruce Estándar y Alta Bioactivación en el genotipo Trans-Heterocigoto (<i>mwh/flr³</i>)	32
2. Evaluación de la genotoxicidad producida por MMC y CPH en el	

Área de Farmacología/IIIFB/Carrera de Química Farmacéutica/FCFB

Cruce Estándar y Alta Bioactivación en el genotipo Heterocigoto (<i>mwh</i> /TM3).....	38
3.Comparación de la Frecuencia Total de Manchas producidas por MMC y CPH en ambos Cruces en el genotipo <i>mwh/flr</i> ³	
4. Comparación de la Frecuencia Total de Manchas producidas por MMC y CPH en ambos Cruces en el genotipo <i>mwh</i> /TM3.....	40
VI. DISCUSIONES	43
VII. CONCLUSIONES	48
VIII. RECOMENDACIONES.....	49
10 BIBLIOGRAFÍA.....	50
ANEXOS.....	56
GLOSARIO.....	60



INDICE DE FIGURAS

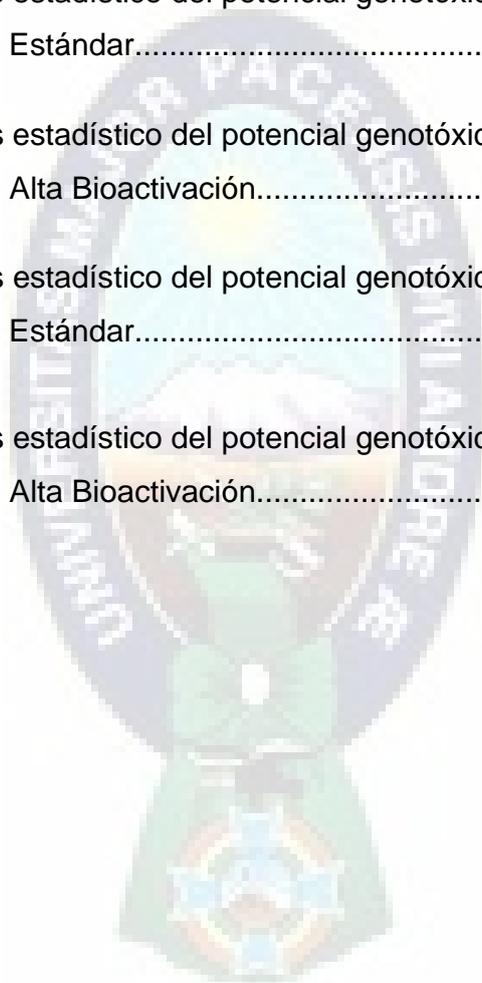
	Pág.
FIGURA 1. Reacciones de activación o inactivación mediadas por enzimas.....	7
FIGURA 2. Traspaso de electrones desde el NADPH al citocromo P-450, catalizado por la enzima de membrana NADPH citocromo P-450 reductasa.....	9
FIGURA 3. Alquilación de una guanina por un metabolito de la Ciclofosfamida.....	11
FIGURA 4. Biotransformación del anticancerígeno Ciclofosfamida... ..	13
FIGURA 5. Secuencia de transferencia electrónica y producción de intermediarios a partir de una semiquinona.....	15
FIGURA 6. Activación bioeductiva de Mitomicina C y su ligación al DNA.....	16
FIGURA 7. Ciclo de vida de <i>Drosophila melanogaster</i>	19
FIGURA 8. Marcadores genéticos empleados en el test de SMART a) Pelo normal, b) marcador <i>mwh</i> y c) marcador <i>flr³</i>	21
FIGURA 9. Clasificación de las manchas analizadas en SMART.....	23
FIGURA 10. Áreas de Lectura del ala de <i>Drosophila melanogaster</i>	29

INDICE DE GRAFICOS

	Pág.
GRAFICO 1. Participación relativa de diferentes enzimas de fase 1 en el metabolismo xenobiótico.....	5
GRAFICO 2. Distribución del cit. P-450 en los diversos tejidos del organismo.....	6
GRAFICO 3. Frecuencia de manchas producidas por MMC y CPH en el Cruce Estándar y Alta Bioactivación en el genotipo Trans-Heterocigoto (<i>mwh/flr³</i>).....	37
GRAFICO 4. Frecuencia de manchas producidas por MMC y CPH en el Cruce Estándar y Alta Bioactivación en el genotipo Heterocigoto (<i>mwh/TM3</i>).....	39
GRAFICO 5. Frecuencia Total de manchas producidas por MMC y CPH en el Cruce Estándar y Alta Bioactivación del genotipo Trans-Heterocigoto (<i>mwh/flr³</i>).....	41
GRAFICO 6. Frecuencia Total de manchas producidas por MMC y CPH en el Cruce Estándar y Alta Bioactivación del genotipo Heterocigoto (<i>mwh/TM3</i>).....	42

INDICE DE TABLAS

	Pág.
TABLA 1. Cantidad de las larvas utilizadas por concentración de muestra.....	28
TABLA 2. Análisis estadístico del potencial genotóxico de MMC mediante el Cruce Estándar.....	33
TABLA 3. Análisis estadístico del potencial genotóxico de MMC mediante el Cruce Alta Bioactivación.....	34
TABLA 4. Análisis estadístico del potencial genotóxico de CPH mediante el Cruce Estándar.....	35
TABLA 5. Análisis estadístico del potencial genotóxico de CPH mediante el Cruce Alta Bioactivación.....	36



I. INTRODUCCION

Actualmente, en la práctica médica se emplean un gran número de medicamentos, ya sean de origen vegetal o sintético, que no pueden ser empleados de forma racional ni segura si no existe un conocimiento acabado de su acción farmacológica y farmacocinética, así como también de su toxicidad (Litter, 1984).

Las características lipófilas de muchos de estos compuestos exógenos facilitan el paso por las membranas biológicas y el acceso a todo el organismo, sin embargo, dificultan su eliminación de estos. La biotransformación de fármacos y otros productos xenobióticos así como también productos endógenos en metabolitos más hidrófilos resulta esencial para que cese su actividad biológica y sean eliminados del cuerpo (Goodman and Gilman, 1998).

Dicho de otra manera, las reacciones de biotransformación, las cuales en su mayoría se llevan a cabo en el sistema de citocromos P- 450 que se encuentran en el citoesqueleto y en el retículo endoplásmico de las células con núcleo, y cuyos productos intermedios así generados en ocasiones se conjugan con proteínas, generan metabolitos inactivos más polares, para que puedan ser fácilmente excretados del organismo. Sin embargo, en algunos casos se producen metabolitos con potente actividad biológica o con propiedades tóxicas (<http://es.geocities.com/ecored2000/coctel.html>). Es decir, en las células existen numerosas enzimas que activan en este caso a los medicamentos promutágenos, pero también otras enzimas que desintoxican e inactivan a los productos intermedios. El equilibrio entre estas dos funciones celulares, es el que en última instancia determina el potencial genotóxico del promutágeno. De tal manera que este compuesto electrofílico terminal, puede llegar a interactuar con diversas macromoléculas, como por ejemplo los átomos nucleofílicos del DNA, es decir los centros que pueden ser atacados por moléculas electrofílicas,

como por ejemplo el nitrógeno 7 y el oxígeno 6 de la guanina (<http://es.geocities.com/ecored2000/coctel.html>), causando muchas veces daños irreversibles en este sistema llegando a producir mutaciones de diversa índole.

Una técnica capaz de determinar la toxicidad y genotoxicidad de una variedad infinita de agentes xenobióticos como por ejemplo fármacos ampliamente empleados en el tratamiento de diversas enfermedades es la prueba de Mutación y Recombinación Somática (SMART), que se manifiesta a través de la expresión genética de células mutantes producidas por dichos compuestos, dando a conocer de este modo un amplio espectro de mutaciones, tales como mutación puntual, deleciones, ciertos tipos de aberraciones cromosómicas así como también recombinación mitótica (Graf *et al.*, 1989 y 2000; Vogel *et al.*, 1999; Spanó *et al.*, 2001).

Esta prueba biológica *in vivo*, emplea a *Drosophila melanogaster*, llamada también mosca de la fruta, como organismo experimental, y ha sido y continúa siendo ampliamente utilizada a nivel mundial por la alta sensibilidad y fiabilidad que presentan sus resultados. Un aspecto importante, que presenta esta técnica, es que detecta agentes xenobióticos que requieren o no de una activación metabólica.

Con la aplicación de la técnica de SMART una gran variedad de trabajos fueron realizados para determinar los potenciales que poseen ciertos medicamentos. Así por ejemplo, Hansjörg y colaboradores (1992), determinaron la actividad genotóxica del fármaco anticancerígeno mitoxantrone demostrando poseer una actividad genotóxica a través de SMART. En México se demostró la inducción de recombinación mitótica inducida por muchos agentes alquilantes mono y bi-funcionales a través de SMART (Rodríguez-Arnaiz., *et al.*, 1996). Sin

Área de Farmacología/IIIFB/Carrera de Química Farmacéutica/FCFB

embargo en Bolivia, son muy pocas las investigaciones efectuadas en el ámbito de la genética toxicológica..

De este modo, un sin fin de compuestos pueden ser evaluados por esta técnica. En este caso, anticancerígenos como la Mitomicina C y la Ciclofosfamida, empleadas para el tratamiento de diversos tipos de cáncer, ya sea que requieran activación metabólica o no para cumplir su función en el organismo, fueron analizadas por esta técnica, tratando de verificar la vía metabólica por la que son biotransformadas, su activación ó inactivación a través de ella y su actividad genotóxica. Siendo de esta manera de mucha utilidad estandarizar dicho método en el laboratorio de Farmacología de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas para el análisis genotóxico de diferentes sustancias como ser extractos de plantas ó posibles nuevos medicamentos que vayan a ser empleados por la población boliviana.



II. OBJETIVOS

1. *Objetivo General*

Evaluar la actividad genotóxica producida por Ciclofosfamida y Mitomicina C mediada por su biotransformación a través del sistema citocromo P450, empleando la prueba de Mutación y Recombinación Somática (SMART).

2. *Objetivos específicos*

- Evaluar el daño genético causado por Ciclofosfamida y Mitomicina C mediante Cruce Estándar.
- Verificar si existe un aumento del daño genético causado por Ciclofosfamida y Mitomicina C en el Cruce de Alta Bioactivación respecto al Cruce Estándar.
- Determinar la recombinación somática generada por Ciclofosfamida y Mitomicina C mediante las progenies Trans-Heterocigotos y Heterocigotos de la técnica de SMART.
- Relacionar las vías metabólicas de Mitomicina C y Ciclofosfamida con la actividad genotóxica.

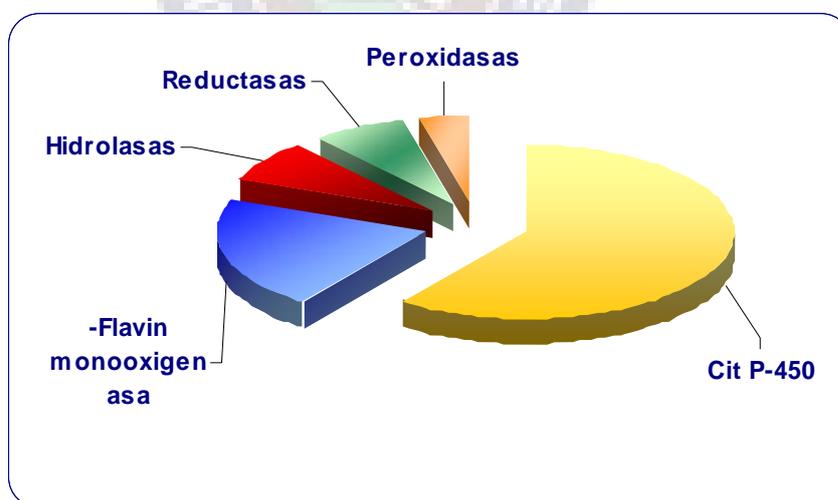
III. ANTECEDENTES

1. Citocromo P-450

Existe una gran cantidad de sustancias extrañas a nuestro organismo denominadas xenobióticos que penetran ya sea por la piel, sangre o pulmones, y que luego de ser distribuidas por todo el organismo son finalmente eliminadas por sistemas enzimáticos que llevan a cabo su biotransformación (Cascales y Gómez, 2004).

La biotransformación de xenobióticos se realiza básicamente en 2 fases:

Fase I, catalizada principalmente por el sistema de monooxigenasas dependiente del citocromo P450, diversas oxidasas (alcohol deshidrogenasa, aldehído deshidrogenasa, amino oxidasas), esterasas y amidasas hepáticas y plasmáticas. (Grafico. 1)

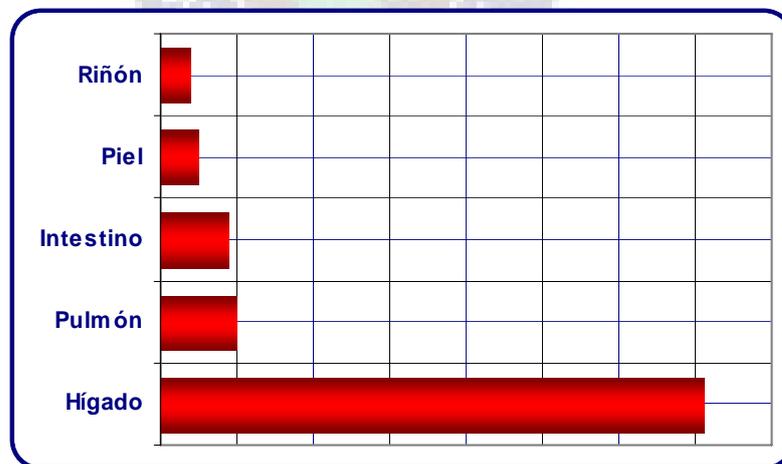


Graf.1 Participación relativa de diferentes enzimas de fase 1 en el metabolismo xenobiótico (Modificado de Cascales y Gómez, 2004).

Las reacciones de conjugación de la fase II, convierten los metabolitos intermediarios procedentes de la fase I en productos finales que son fácilmente eliminados por el organismo, en la que participan una serie de transferasas que catalizan reacciones de conjugación de los xenobióticos con diversas moléculas de naturaleza endógena como ácido glucorónico, sulfatos, acetato, el tripéptido glutatión o algunos aminoácidos.

El objetivo final de ambas fases es aumentar la solubilidad en agua de los compuestos y así facilitar su excreción del organismo a través de la orina o la bilis (Winters *et al.*, 1993).

El sistema de monooxigenasas, es un complejo multi-enzimático cuya oxidasa es una hemoproteína denominada citocromo P-450 (cit P-450) la cual se encuentra presente en diferentes tejidos como el riñón, pulmón, piel, intestino, corteza adrenal, testículos, placenta y otros, pero es particularmente activo en el hígado (Ding *et al.*, 2003) (Grafico. 2).



Graf. 2 Distribución del citocromo P-450 en los diversos tejidos del organismo (Modificado de Cascales y Gómez, 2004).

Además de participar en el metabolismo de sustratos de naturaleza exógena como drogas, pesticidas, procarcinógenos, anestésicos, solventes orgánicos, entre muchos otros (Goepfert *et al.*, 1995), el citocromo P-450 participa en el metabolismo de sustratos endógenos como colesterol, ácidos biliares, hormonas esteroidales y ácidos grasos (Capdevila *et al.*, 2002).

Aunque la principal función del cit. P-450 es participar en reacciones de biotransformación convirtiendo un compuesto farmacológicamente activo en inactivo excretado por la orina, puede transformar compuestos inertes y poco reactivos en otros de gran reactividad química que resultan tóxicos para el organismo (Figura 1).

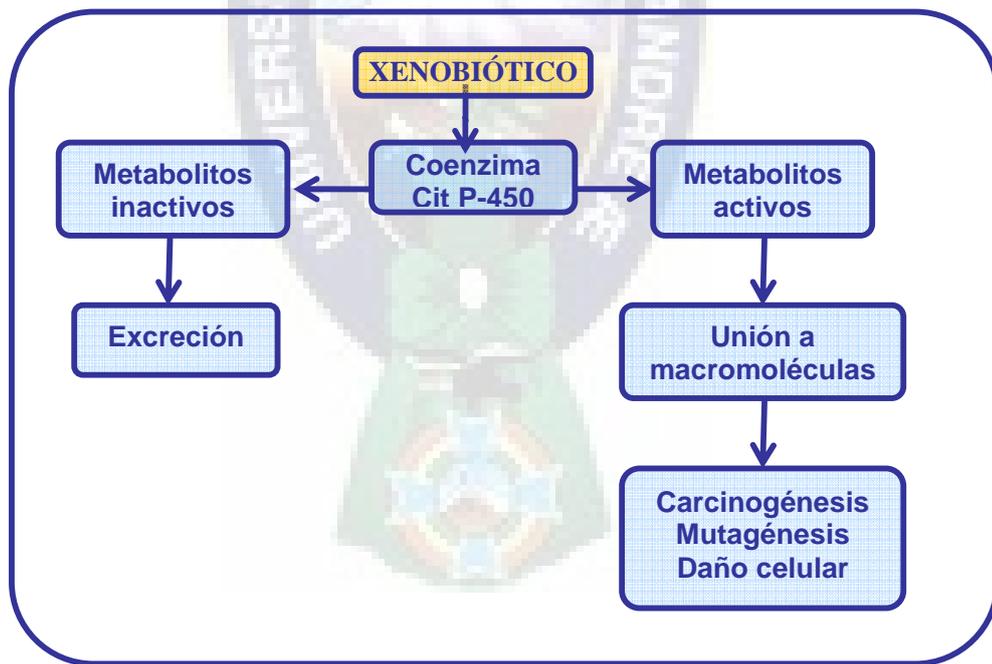
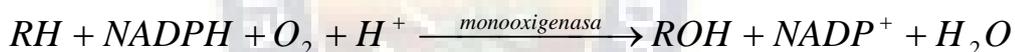


Fig. 1 Reacciones de activación o inactivación mediadas por enzimas Citocromo P-450 (Tomado de Orellana y Guajardo, 2004)

El cit. P-450 interviene fundamentalmente en reacciones de oxidación, también es capaz de catalizar reducciones, hidrataciones o hidrólisis. Entre las oxidaciones catalizadas por el cit. P-450 se incluyen hidroxilaciones aromáticas y alifáticas, N- y S-oxidaciones, epoxidaciones, O-, N- y S-desalquilaciones, desaminaciones, desulfuraciones, deshalogenaciones y deshidrogenaciones (Cascales y Gómez, 2004).

La mayoría de las reacciones catalizadas requieren de un paso inicial, que involucra la inserción de un grupo hidroxilo en el sustrato para formar un intermediario hidroxilado el cual puede, dependiendo de la naturaleza del sustrato y la estabilidad del intermediario, sufrir posteriores reacciones de dealquilación, deaminación, etc. (Hollenberg, 1992).

La reacción general catalizada por el cit. P-450 es la siguiente:



En la reacción de oxidación, el sustrato (fármaco o xenobiótico) reacciona con la forma oxidada del cit. P-450 (Fe^{3+}) para formar un complejo enzima-sustrato; la reductasa acepta un electrón donado por el NADPH el cual reduce al complejo oxidado del cit. P-450-sustrato; el complejo P-450-sustrato reducido (Fe^{2+}) reacciona con el oxígeno molecular y con un segundo electrón del NADPH donado a través de la reductasa para formar oxígeno activado; en las fases finales se libera un átomo de oxígeno en forma de agua, y otro se transfiere al sustrato; una vez liberado el sustrato sometido a oxidación, el enzima oxidado (cit. P-450) se regenera (Alvares y Prat, 1990) (Figura 2).

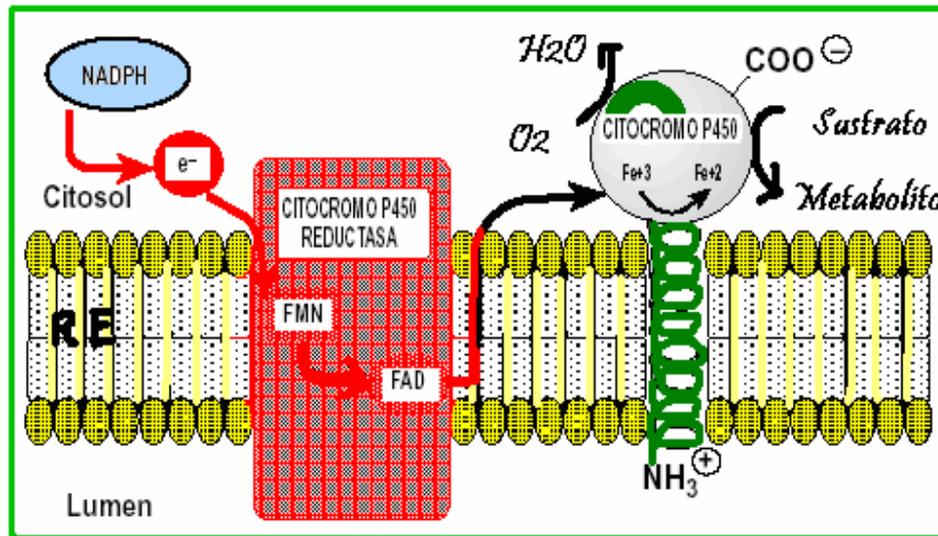


Fig. 2 Traspaso de electrones desde el NADPH al citocromo P-450, catalizado por la enzima de membrana NADPH citocromo P-450 reductasa (Modificado de Orellana y Guajardo, 2004).

Todos los citocromos P-450 conocidos se nombran siguiendo un criterio común y se agrupan en familias y subfamilias en función de la similitud en la secuencia del ADN que los codifica. Las familias 1,2 y 3 están constituidas por enzimas encargados de la biotransformación de xenobióticos, mientras que el resto de familias intervienen en la biosíntesis de compuestos endógenos.

Una de las características más significativas de los cit. P-450 que metabolizan xenobióticos es su baja especificidad, lo que permite que sean capaces de metabolizar un número casi ilimitado de sustratos.

Su expresión está regulada por factores genéticos, fisiopatológicos o ambientales. Por esta razón, sus niveles hepáticos varían entre diferentes individuos, lo que justifica diferencias en el metabolismo de fármacos y xenobióticos (Cascales y Gómez, 2004).

2. Ciclofosfamida

Es una sustancia análoga al gas de mostaza (cloroetilaminas) que debido a que presenta menor toxicidad que las mostazas sulfuradas posee aplicación terapéutica. Es una mostaza nitrogenada heterocíclica y su acción antineoplásica se debe a que contiene dos grupos alquilos funcionales por lo que corresponde al grupo genérico de los alquilantes polifuncionales.

2.1. Mecanismo general de acción

Aunque son muchos los componentes celulares que sufren el proceso de alquilación (ADN, ARN, proteínas y membranas), la hipótesis más aceptada responsabiliza a la interacción con el ADN como el mecanismo más importante de la actividad antitumoral.

La alquilación ocurre cuando el ión carbón electrofílico interactúa ya sea con un grupo amino, carboxil, fosfato, o un grupo sulfidriilo, formando enlaces covalentes. El nitrógeno 7 de la base purina de una guanina, puesto que es altamente nucleofílica, es el sector más importante afectado por los agentes alquilantes. Su alquilación produce importantes cambios en las propiedades químicas de la guanina. La carga positiva generada en el anillo imidazólico lo hace más lábil, favoreciendo la forma de tautómero enólico. Como consecuencia, la guanina puede mostrar preferencia por emparejarse con la timina en lugar de hacerlo con su pareja natural, la citosina; puede favorecerse la hidrólisis y sufrir el proceso de despurinación, desestabilizando así localmente el ADN y favoreciendo la escisión de la cadena; finalmente, puede abrirse el anillo imidazólico, lo que también ocasiona la despurinación. Las dos hebras del DNA pueden sufrir una alquilación bifuncional que se manifiesta en forma de un puente de tipo covalente entre dos guaninas, bien dentro de una misma hebra o entre las dos hebras de la doble hélice, lo que conduce a la incapacidad del DNA de replicarse (Dorr and Fritz, 1980) (Figura 3).

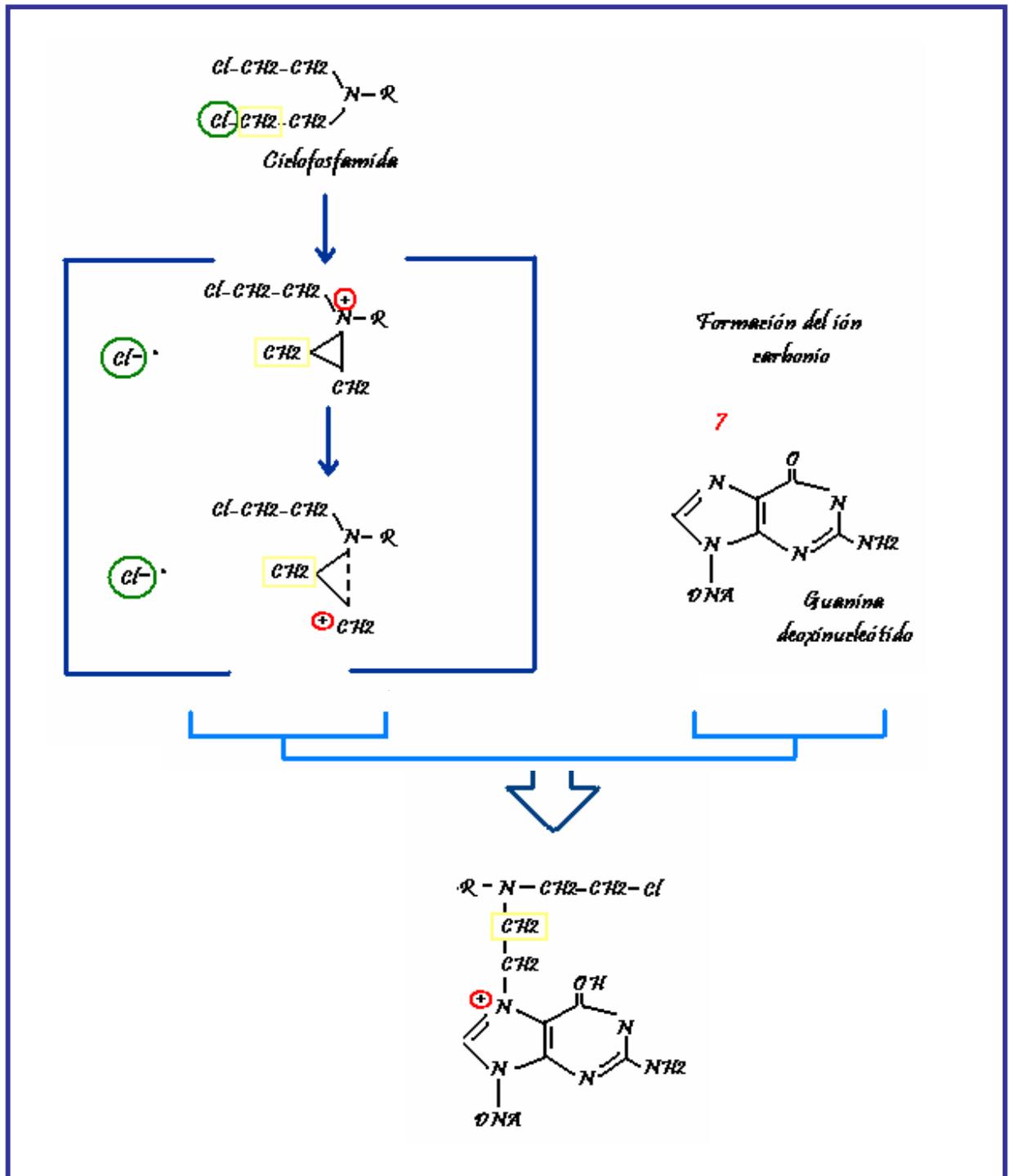


Fig.3 Alquilación de una guanina por un metabolito de la Ciclofosfamida
(Tomado de Dorr and Fritz)

Puede haber también alquilación en bases del ARN, en posiciones similares a las descritas para el ADN. La interacción con enzimas y otras proteínas, tanto por reacciones alquilantes como por otras reacciones propias de los diversos compuestos, también pueden contribuir a la acción citotóxica (Flores, 1998).

2.2. Propiedades y características farmacocinéticas

La ciclofosfamida, es un profármaco que en el organismo se transforma en 4-hidroxiciclofosfamida (4-OHCF) y aldofosfamida mediante el sistema de oxidasas mixtas P-450-dependientes, las cuales presentan actividad citotóxica alquilante. Los estudios in vitro con microsomas hepáticos humanos e isoenzimas clonadas P-450 han demostrado que la ciclofosfamida es activada por el grupo citocromo 2B de isoenzimas P- 450 (Goodman and Gilman, 1998).

La aldofosfamida produce espontáneamente acroleína y deja libre la mostaza fosforamida, que posee alta capacidad alquilante, además, la aldofosfamida produce, por oxidación enzimática, carboxifosfamida y mostaza nornitrógeno, pero los principales efectos alquilantes y citotóxicos se deben a la 4-OHCF y a la mostaza fosforamida (Figura. 4).

La identificación de la ciclofosfamida, sin modificaciones en orina y heces, después de administración intravenosa es mínima puesto que menos del 20 % de la ciclofosfamida se elimina como tal por el riñón. Una hora después de ingerido el fármaco, se detectan concentraciones máximas en plasma, y la vida media plasmática es de unas siete horas. Pero en caso de insuficiencia renal aumenta la semivida de eliminación; la ciclofosfamida es capaz de atravesar la barrera hematoencefálica (Flores, 1998).

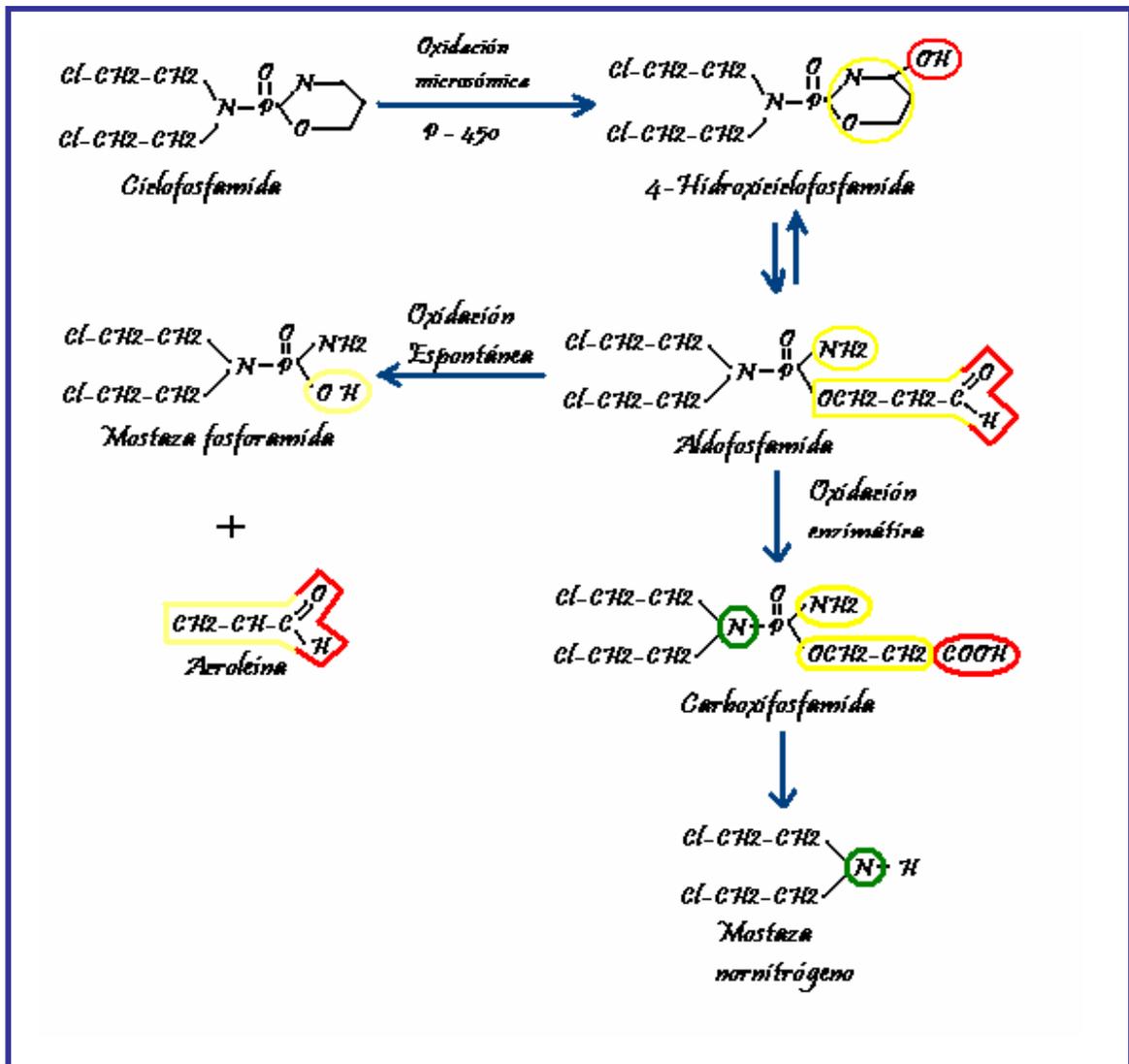


Fig. 4 Biotransformación del anticancerígeno Ciclofosfamida (Tomado de Gurtoo et al., 1981)

2.3. Reacciones Adversas

Produce toxicidad aguda en forma de náuseas y vómitos, puede ocasionar reacciones anafilactoides, borrosidad de visión y confusión. Como toxicidad diferida destaca la depresión de médula ósea, pero es más fácilmente reversible que con otros agentes alquilantes y afecta en menor grado las

plaquetas; produce cistitis hemorrágicas controlables con alopecia, disminución de la secreción de hormona antidiurética con retención hídrica e hiponatremia (Goodman and Gilman, 1998).

2.4. Aplicaciones terapéuticas

Como antineoplásica, la ciclofosfamida es particularmente útil por su amplio espectro de acción, la facilidad de administración y el rango amplio de dosis que se puede utilizar. De ahí que su empleo sea extenso, principalmente en combinación con otros fármacos. Es muy útil en la enfermedad de Hodgkin y otros linfomas, en el linfoma de Burkitt y en la leucemia linfoblástica aguda de la infancia. En combinación se emplea en otros muchos tipos de cáncer. El régimen de administración es muy variado; son dosis pequeñas las dosis de 2-3 mg/kg por vía oral o IV; pueden usarse 4-8 mg/kg IV durante 6 días, seguidos como dosis oral de mantenimiento por 1- 5 mg/kg/día, o bien 3-5 mg/kg IV, 2 veces por semana, o 10-15 mg/kg IV cada 7-10 días. En ocasiones se prefiere una dosis única y muy alta de 30 mg/kg, o una dosis de 40-50 mg/kg IV en infusión durante 2-5 días (Flores, 1998).

3. Mitomicina C

Es un antibiótico antineoplásico correspondiente al grupo de los mitosanos que se extrae de cultivos de bacterias *Streptomyces caespitosus*.

3.1. Mecanismo general de acción

En el organismo es activado, bien por reducción química espontánea o enzimática de la quinona y pérdida del grupo metoxi, convirtiéndose así en un agente bifuncional o trifuncional (Goodman and Gilman, 1998), los cuales vienen a ser productos reactivos intermedios con capacidad alquilante. Nishibayashi et al. postuló que el citocromo NADPH P-450 reductasa cataliza la reducción de un electrón de las quinonas. Así mismo, Iyanagi y Yamazaki,

demostraron que esto ocurre con la ayuda de una flavoproteína obteniéndose como producto final una semiquinona. Se ha determinado también que estas quinonas, pueden dar lugar a un radical libre intermediario. Ambos productos interactúan posteriormente con el DNA, siendo de esta manera responsables de su elevada citotoxicidad (Figura 5).

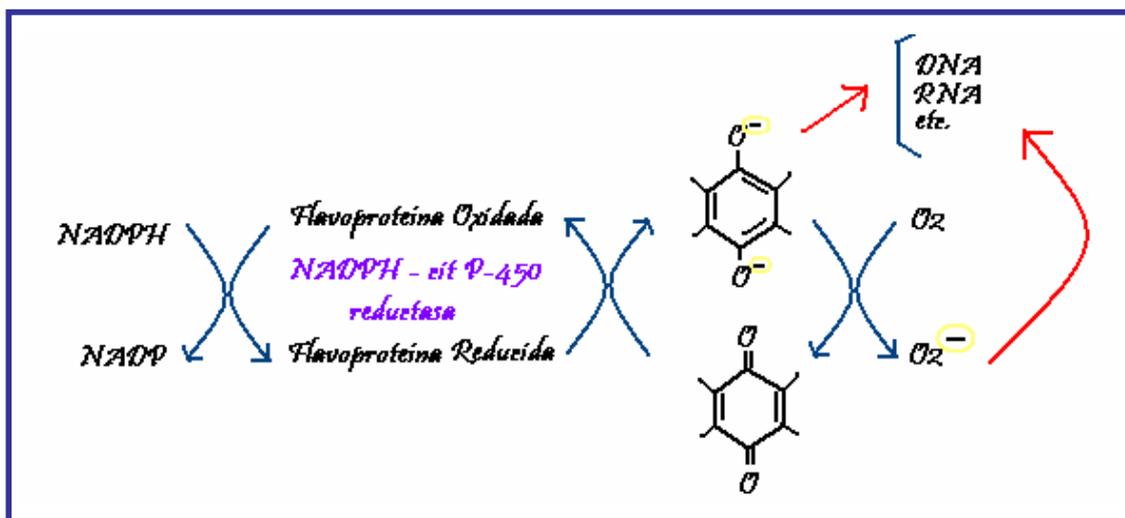


Fig. 5 Secuencia de transferencia electrónica y producción de intermediarios a partir de una semiquinona (Tomado de Bachur *et al.*, 1979).

Este fármaco inhibe la síntesis de DNA y los enlaces cruzados de dicho ácido en las posiciones nitrógeno 6 (N⁶) de la adenina o las posiciones oxígeno 6 (O⁶) o nitrógeno 7 (N⁷) de la guanina (Figura 6). También ocasiona una rotura monocatenaria de DNA y roturas cromosómicas. Ha resultado teratogénico y carcinógeno en roedores (Goodman and Gilman, 1998).

3.2. Características farmacocinéticas

Se absorbe mal por vía oral y por lo tanto es necesario administrarla por vía intravenosa. Tras administración IV desaparece del plasma en dos fases, la primera de 2-7 min. y la segunda de 30-45 min.; se distribuye con gran rapidez en los tejidos pero atraviesa mal la barrera hematoencefálica. La mitomicina C

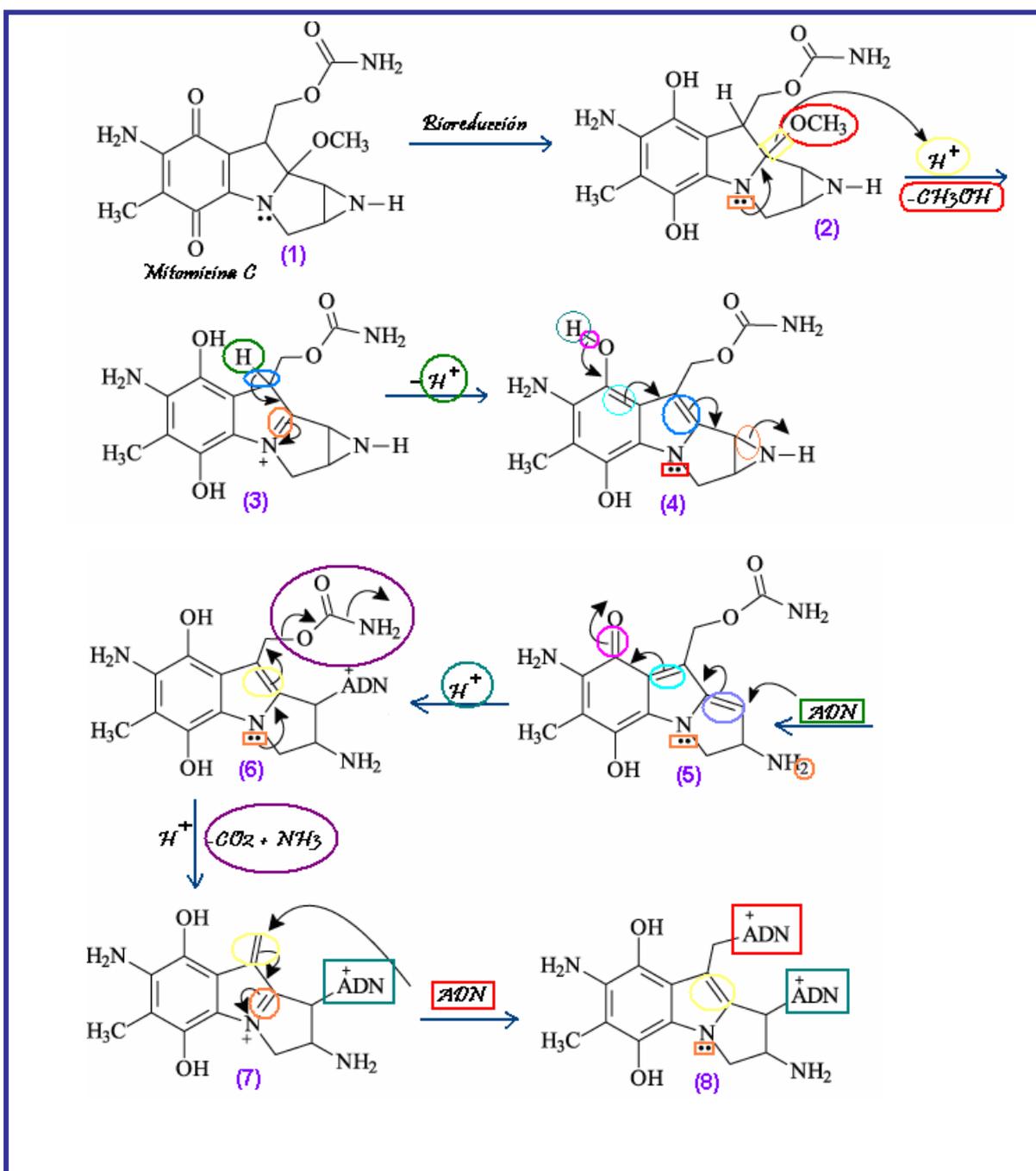


Fig. 6 Activación bioreductiva de Mitomicina C y su ligación al DNA
(Tomado de He et al., 2001)

es inactivada por metabolismo o conjugación química, y menos de 10% del fármaco activo se excreta por la orina o la bilis.

3.3. Toxicidad clínica

Es bastante tóxica; produce náuseas y vómitos, diarrea, irritación local si hay extravasación, y mielodepresión que aparece entre 5 y 8 días después de la administración, con trombocitopenia y leucopenia. Además, puede producir insuficiencia renal a la dosis de 180 mg.; en ocasiones se han descrito infiltrados y fibrosis pulmonares, alopecia y estomatitis.

Puede darse en ciertos carcinomas como el de pulmón de células no pequeñas, los de páncreas, cuello, colon y recto, y en el melanoma. La dosis es de 2 mg/m²/día durante 5 días, o de 10-20 mg/m² una vez cada 6-8 semanas.

4. Test de Mutación y Recombinación Somática (SMART)

Uno de los procesos de gran importancia entre todos los sistemas biológicos, el cual abarca desde virus hasta eucariotes complejos, es la recombinación genética. Proceso que contribuye a la variabilidad genética y por lo tanto a la evolución de la especie.

Por años, la genética toxicológica ha sido empleada para determinar mutaciones en los genes, aberraciones cromosómicas, y más recientemente aneuploidías. Sin embargo, nuevas evidencias demuestran que muchos agentes que causan daño a nivel del DNA también son capaces de producir recombinación genética. (Spanó *et al.*, 2001). Más tarde, se demostró que la recombinación genética es también responsable de la pérdida de heterocigocidad tanto en células germinales como en células somáticas. Esta pérdida de heterocigocidad, es entonces responsable de la manifestación de enfermedades hereditables recesivas o la generación de neoplasias (Spanó *et al.*, 2001).

Es así que la preocupación ocasionada por una infinidad de compuestos generados cada día para el consumo humano, capaces de producir daño a nivel genético, ha llevado al desarrollo de nuevos y mejores métodos para poder determinar dicho daño, tal es el caso del Test de Mutación y Recombinación Somática (SMART).

La técnica de SMART ha sido ampliamente utilizada para análisis genotóxicos, es capaz de detectar diferentes tipos de mutaciones como ser, mutaciones génicas y cromosómicas, ocasionados por eventos aneugénicos (pérdida de cromosomas enteros) o clastogénicos (pérdida de fragmentos cromosómicos), y recombinación somática (Pillco, 2003).

Esta técnica emplea a *Drosophila melanogaster* (ver anexo 10), también conocida como “mosca de la fruta” como organismo experimental. *Drosophila melanogaster* fue uno de los primeros animales ampliamente estudiados genéticamente, y fue reconocido como el animal experimental ideal para la realización de estudios genéticos por las diversas características que esta presenta, como ser:

- Tamaño pequeño (alrededor de 3 mm. de longitud)
- Fácil mantenimiento en laboratorio y económico por los materiales y reactivos que implican su manutención.
- Corto tiempo de generación (Figura 7)
- Elevada cantidad de progenie
- Capacidad para metabolizar los compuestos químicos en forma similar a los mamíferos.
- Amplio conocimiento de sus características biológicas

Además de la alta similitud entre rutas bioquímicas y funciones reguladoras que presenta en comparación con el ser humano, pudiendo proporcionar de este modo resultados extrapolables a este, con un elevado índice de acierto (Ribeiro and Rodrigues, 2002).

Esta técnica se basa en el hecho de que durante el desarrollo embrionario de la mosca, específicamente en el tercer estadio larval, unos grupos de células (discos imaginales) se diferencian hasta alcanzar estructuras del cuerpo de la mosca adulta como lo son las alas, mediante división mitótica durante la etapa de metamorfosis (Figura 7).

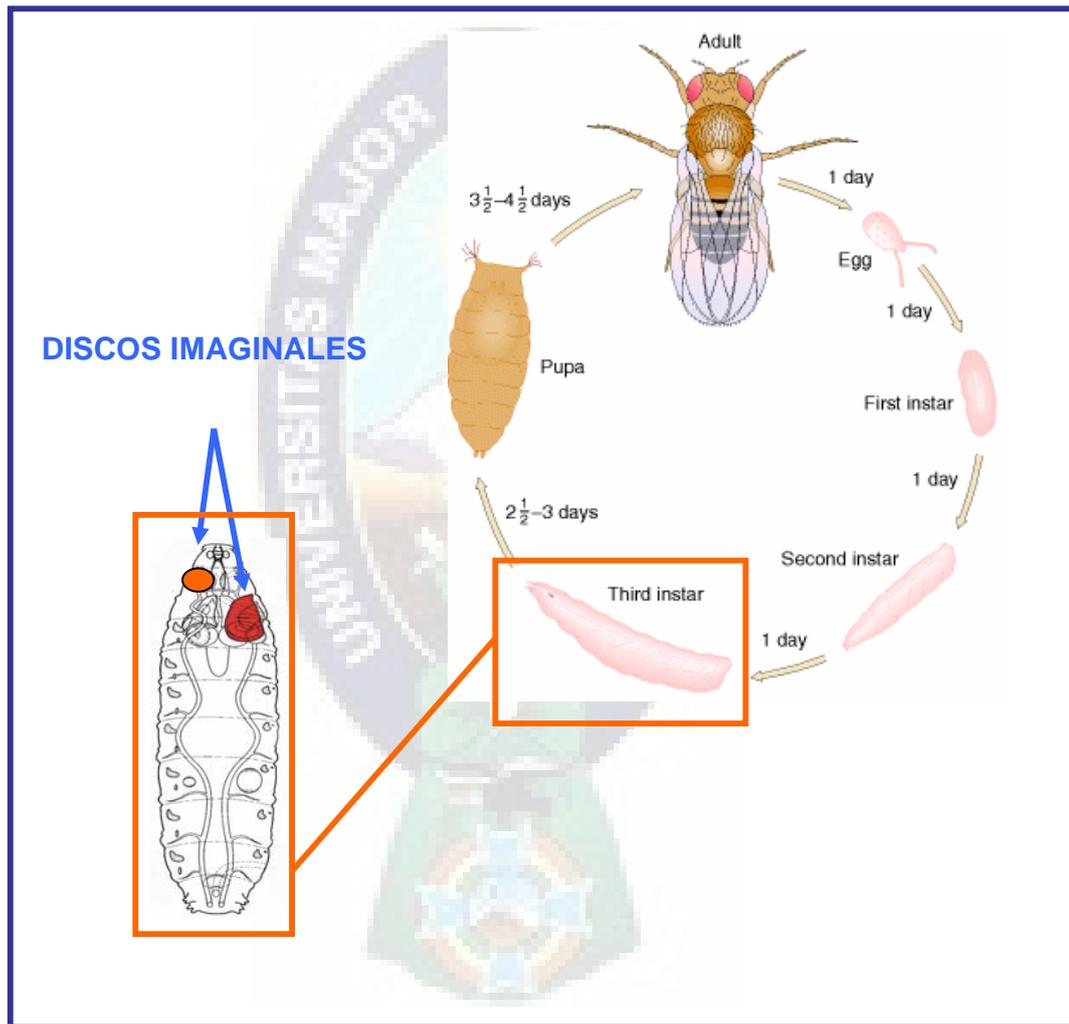


Fig. 7 Ciclo de vida de *Drosophila melanogaster* (Tomado de Ribeiro and Rodriguez, 2002)

Es por esto que los ensayos en células somáticas, aprovechan la posibilidad de exposición de ciertos compuestos en esta etapa de desarrollo de las larvas. Así, si existe una alteración genética que origine la pérdida de heterocigocidad en una de estas células del disco imaginal, esta alteración se presentará en todas las células descendientes y formará un grupo de células mutantes. Como la alteración causa un cambio visible en el fenotipo, este es detectado como mancha de las células mutadas en la superficie de las alas de la mosca adulta denominadas manchas mutantes (Graf *et al.*, 2000).

Con el fin de obtener marcadores genéticos que hagan evidentes los mecanismos genéticos que originan dichas manchas, en diferentes especies de este organismo se han producido numerosas mutaciones. Los marcadores genéticos (ver anexo 9) que se emplean para la observación de dichas manchas son:

- ***mwh***: (Multiple wing hair ó formación de pelos multiples), que muestra fenotípicamente tres o más pelos en lugar de uno (Figura 8b).
- ***flr*³** (flare ó flama): muestra fenotípicamente un ensanchamiento en la base del pelo (Figura 8c) a diferencia de la delgada que presenta el pelo normal (Figura 8a).

Así mismo, estas manchas pueden clasificarse en:

- **Manchas Simples Pequeñas (MSP) y Manchas Simples Grandes (MSG)**: que pueden expresar el marcador genético *flr*³ ó *mwh* (Figura 9a y 9b).

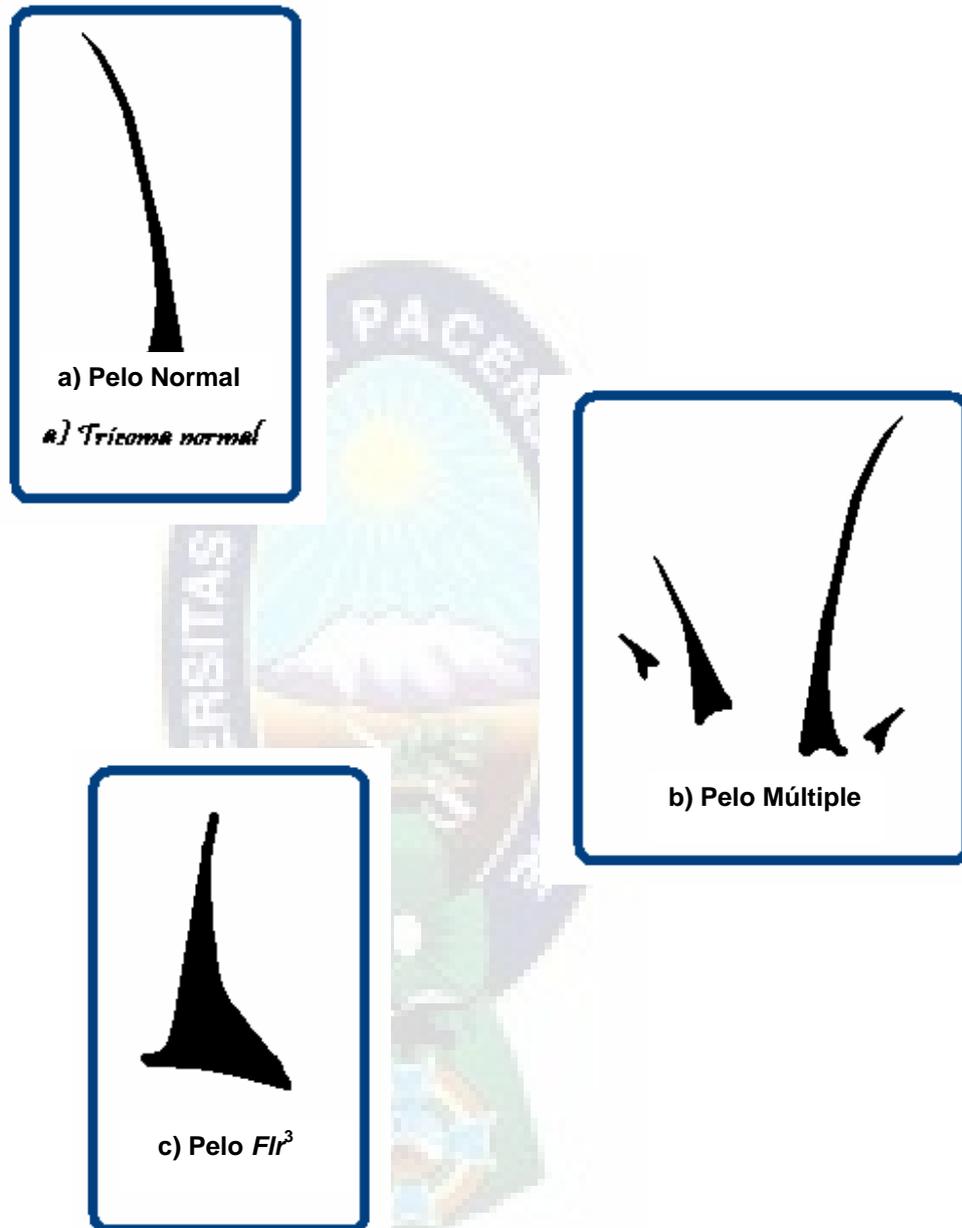


Fig. 8 Marcadores genéticos empleados en la prueba de SMART, representados por la mutación de los pelos del ala de *Drosophila melanogaster* a) Pelo normal, b) pelo *mwh* y c) pelo *flr*³

Se expresan solo una ó dos células en el primer caso, y más de dos células en el segundo caso. Este tipo de manchas se deben a mutaciones de tipo puntual, deleción, no disyunción ó recombinación entre el gen *flr³* y *mwh* (Graf *et al.*, 1984) (ver anexo 8).

- **Mancha Gemela (MG):** que expresa los marcadores genéticos de *flr³* y *mwh* (Figura 9c). Este tipo de mancha se debe a la recombinación genética entre el gen *flr³* y el centrómero. (Graf *et al.*, 1984)

El número total de manchas encontradas, nos brinda información cuantitativa a cerca de la actividad genotóxica del agente evaluado, mientras que el tipo de mancha indica el tipo de lesión ocasionada por dicho agente. Existen dos tipos de cruces para analizar dichos individuos:

- **Cruce Estándar:** donde hembras de la cepa *flr³/In (3LR)TM3, ri p^p sep 1(3)89Aa bx^{34e} and Bd^s* fueron cruzadas con machos del linaje *mwh/mwh* y se caracteriza por que presenta niveles basales de enzimas de metabolización, por lo que detecta genotoxinas de acción directa (Mutágenos).
- **Cruce de Alta Bioactivación:** donde hembras de la cepa *ORR/ORR; flr³ / In (3LR)TM3, ri p^p sep 1(3)89Aa bx^{34e} and Bd^s* fueron cruzadas con machos del linaje *mwh/mwh* y detecta genotoxinas de acción indirecta. Este es el caso de los promutágenos, cuya activación requiere de las rutas metabólicas dependientes del cit. P-450. Ya que este cruce se caracteriza por poseer niveles elevados de dicha enzima. Para mayor información a nivel genético revisar el artículo de Lindsley, 1992.

Tanto el Cruce Estándar como el Cruce de Alta Bioactivación, producen dos tipos de progenies los cuales pueden ser distinguidos fenotípicamente:

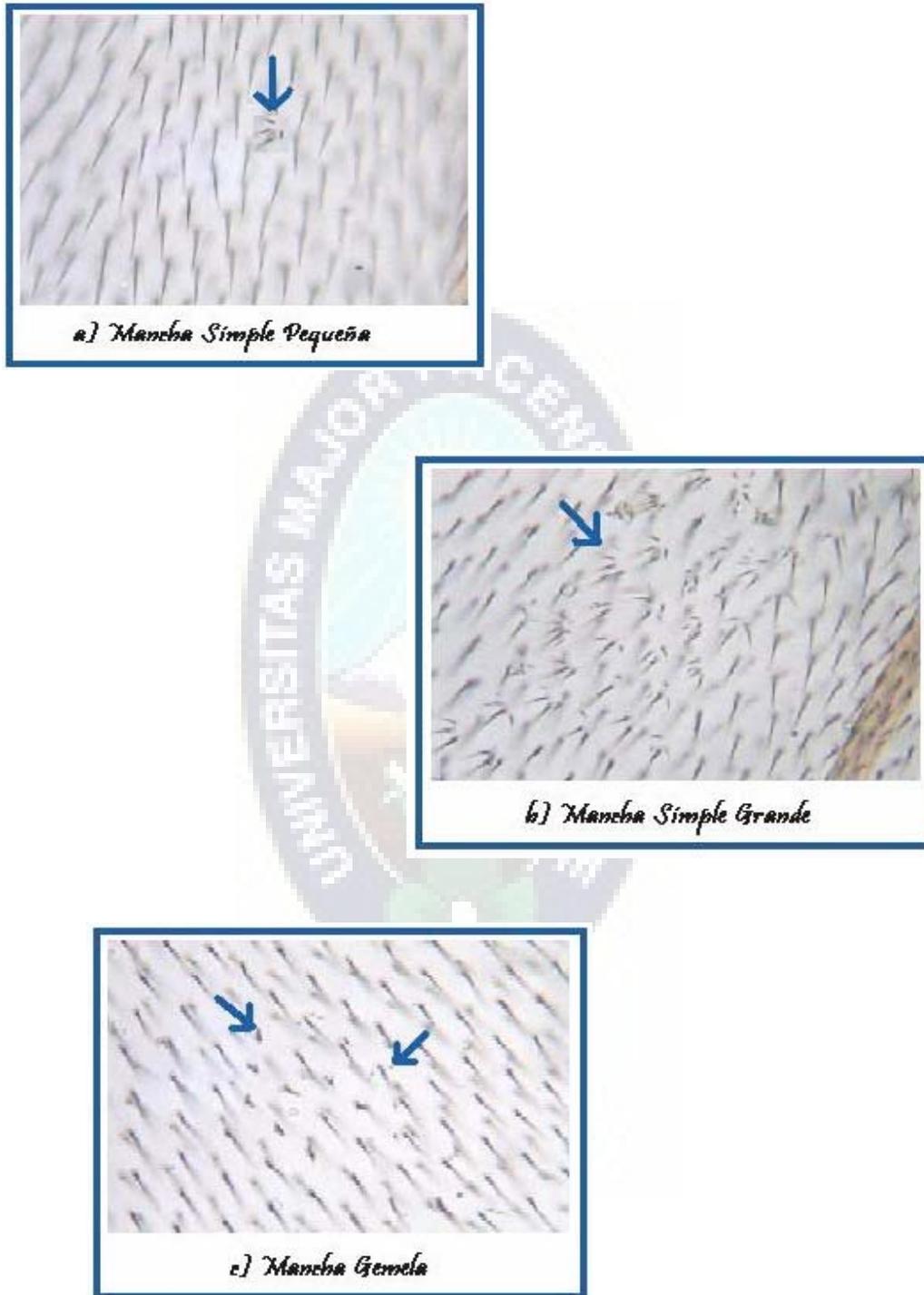


Fig. 9 Clasificación de las manchas analizadas en SMART: a) Mancha Simple Pequeña, b) Mancha Simple Grande y c) Mancha Gemela

Área de Farmacología/IIIFB/Carrera de Química Farmacéutica/FCFB

- **Individuos Trans-heterocigotos (mwh/flr^3):** Presentan el borde del ala lisa y ofrecen información a cerca de mutaciones génicas, cromosómicas y recombinación.
- **Individuos Heterocigotos ($mwh/TM3$):** Presentan el borde del ala cortada y ofrecen información de mutación génica y cromosómica, pero no recombinogénica.

La diferencia de los eventos genotóxicos que se generan en dichas progenies, nos ayuda a determinar el daño genético producido por los diferentes compuestos ocasionado particularmente por la recombinación genética, proceso que contribuye significativamente a la generación de algunos tipos de cáncer (Ribeiro and Rodrigues, 2002).



IV METODOLOGÍA

1. Obtención de la muestra

Mitomicina C:

Obtenida de Schmidts Pharma. Edificio Hansa, 6º piso.

Receta suministrada por el Dr. Medina del Hospital General. Unidad de Oncología.

Marca: Laboratorios Kampel Martian S.A..

Buenos Aires – Argentina

Composición:

- Mitomicina C 5 mg

- Manitol c.s.

Lote: 240503

Vencimiento: 05/05

Ciclofosfamida:

Obtenida de Schmidts Pharma. Edificio Hansa, 6º piso.

Receta suministrada por el Dr. Medina del Hospital General. Unidad de Oncología.

Marca: Laboratorios Baxter Oncology GmbH – Alemania

Composición:

- Ciclofosfamida 534,5 mg

- H₂O equivalente a 500 mg

Lote: 3K113C

Vencimiento: 09/06

Drosophila melanogaster:

Obtenida de: Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Laboratorio de Mutagenese – Facultad de Ciencias

PhD. Heloisa Rodrigues de Andrade (2004).

2. Preparación de la Muestra

Cálculos para Mitomicina C:

$$3mM : 5mL \frac{3mM}{1000 mL} \times \frac{1mol}{1000 mM} \times \frac{334,3g}{1mol} = 0.005014 gMMC = 5mgMMC$$

Para 0.05mM :

$$V1 = \frac{0.05mM \times 11mL}{3mM} = 0.183mL = 183\mu L \text{ de alícuota} + 10,8mL \text{ de H}_2\text{O (d)}$$

Para 0.025mM :

$$V1 = \frac{0.025mM \times 11mL}{3mM} = 0.0916mL = 91\mu L \text{ de alícuota} + 10,9mL \text{ de H}_2\text{O(d)}$$

5mg de MMC fueron disueltos en 5mL de H₂O(d). De esta dilución, se tomó una alícuota de 183μL y se la diluyó con 10,8mL de H₂O(d) para obtener 11mL de una concentración de 0.05mM, y otra alícuota de 91μL se la diluyó con 10,9mL de H₂O(d) para obtener 11mL de una concentración de 0.025mM.

Cálculos para Ciclofosfamida:

$$10mM : 11mL \frac{10mM}{1000 mL} \times \frac{1mol}{1000 mM} \times \frac{261g}{1mol} = 0.02871 gCPH = 28,71mgCPH$$

Para 2mM :

$$V1 = \frac{2mM \times 11mL}{10mM} = 2,2mL = 2mL + 200\mu L \text{ de alícuota} + 8,8mL \text{ de H}_2\text{O(d)}$$

Para 1mM :

$$2,2mL / 2 = 1,1mL = 1mL + 100\mu L \text{ de alícuota} + 9,9mL \text{ de H}_2\text{O(d)}$$

De 11mL de CPH se tomó una alícuota de 2,2mL, se la diluyó con 8,8mL de H₂O(d) para obtener 11mL de una concentración de 2mM, y otra alícuota de 1,1mL, se la diluyó con 9,9mL de H₂O(d) para obtener 11mL de una concentración de 1mM.

3. Cruces Estándar y Alta Bioactivación

- **Cruce estándar:** donde hembras de la cepa *flr³/In (3LR)TM3, ri p^p sep 1(3)89Aa bx^{34e} and Bd^s* fueron cruzadas con machos del linaje *mwh/mwh*
- **Cruce de Alta Bioactivación:** donde hembras de la cepa *ORR/ORR; flr³/In (3LR)TM3, ri p^p sep 1(3)89Aa bx^{34e} and Bd^s* fueron cruzadas con machos del linaje *mwh/mwh*.

4. Aislamiento y tratamiento de larvas

Después de realizados los cruces, se procedió al recuento de larvas de tercer estadio procedentes de los cruces Estándar y Alta Bioactivación. Un número de 100 larvas por cada concentración de muestra (0.025mM y 0.05mM para la MCC, 1mM y 2mM para la CPH y para el Control Negativo–H₂O), fueron trasladadas a sus respectivos frascos que contenían 1.5g de Drosophila Instant Medium (Carolina Biological Supply, Burlington) y 5 mL de la muestra por un lapso de 48 horas (Tabla1).

	[C] mM	CRUCE	Nº. LARVAS 3º ESTADÍO
MITOMICINA C	0.025	ST	100
	0.05	ST	100
	0.025	HB	100
	0.05	HB	100
CICLOFOSFAMIDA	1	ST	100
	2	ST	100
	1	HB	100
	2	HB	100
Control Negativo	H ₂ O	ST	100
	H ₂ O	HB	100

Tabla 1 Cantidad de larvas utilizadas por concentración de muestra (HB= Cruce de Alta Bioactivación, ST= Cruce Estándar)

Una vez que las larvas se desarrollaron hasta convertirse en moscas adultas, fueron colectadas en viales y mantenidas en alcohol al 70%. Todos los experimentos se llevaron a cabo a una temperatura de 25°C y a una humedad relativa del 60%.

5. Lectura de las alas

Las alas de los cruces Estándar y Alta Bioactivación, de los genotipos Trans-Heterocigotos (*mwh/flr³*) y Heterocigotos (*mwh/TM3*), tanto de hembras como de machos, fueron fijadas sobre los porta objetos empleando solución de Faure, según el procedimiento de Graf et al. 1984.

El lado dorsal y ventral de la superficie de las alas, fueron analizadas bajo el microscopio utilizando un aumento de 640X en busca de la expresión fenotípica de manchas pequeñas, grandes ó gemelas, del marcador genético *mwh* o *flr³*, tomando en cuenta las áreas de lectura descritas por Graf et al. 1984 (Figura 10).

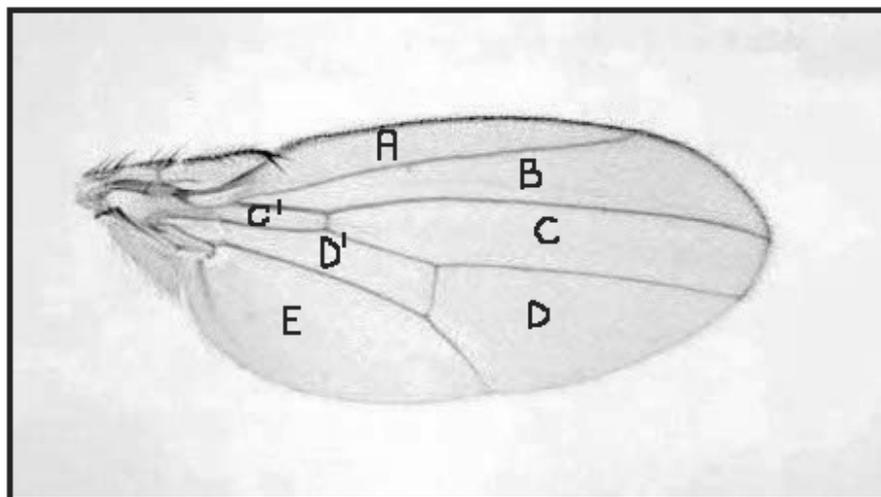


Fig. 10 Áreas de Lectura del ala de Drosophila melanogaster

- **Manchas Simples Pequeñas (MSP):** Cuando uno o dos pelos han sido mutados expresando el fenotipo *mwh* o *flr³*.
- **Manchas Simples Grandes (MSG):** Cuando más de dos pelos han sido mutados expresando el fenotipo *mwh* o *flr³*.
- **Manchas Gemelas (MG):** Cuando los pelos mutados expresan tanto el fenotipo *mwh* como *flr³* ubicados adyacentemente.

6. Análisis Estadístico

El análisis estadístico empleado fue el Test Binomial Condicional de Kastenbaum – Bowman, el cual se basa en la formulación de 2 hipótesis que permiten distinguir si un resultado es positivo, negativo o inconclusivo (Frei and Würigler, 1988).

- **Hipótesis Nula (H₀):** Cuando no existe diferencia en la frecuencia de mutaciones entre el control negativo y las muestras tratadas.
- **Hipótesis Alternativa (H₁):** Cuando la frecuencia de las mutaciones de las muestras tratadas son mayores a los del control negativo.

Las respuestas generadas en base a estas hipótesis son:

- **Respuesta Positiva:** El rechazo de la H₀ indica que la frecuencia de las mutaciones de las muestras tratadas resultó mayor a la frecuencia de las mutaciones del control negativo.
- **Respuesta Negativa:** El rechazo de la H₁ indica que la frecuencia de las mutaciones de las muestras tratadas no fue suficiente como para ser

Área de Farmacología/IIIFB/Carrera de Química Farmacéutica/FCFB

considerado mutagénico, es decir, resultó menor a la frecuencia de las mutaciones del control negativo.

- **Respuesta Inconclusa:** Cuando ninguna de las 2 hipótesis son rechazadas puesto que los datos obtenidos no fueron significativos como para generar un resultado positivo (Frei and Würigler, 1988).



V. RESULTADOS

La genotoxicidad de dos medicamentos anticancerígenos Mitomicina C (MMC) y Ciclofosfamida (CPH), fue analizada empleando la prueba de SMART con un nivel de significancia de $\alpha = \beta = 0.05$. La MMC fue empleada en concentraciones de 0.025 y 0.05mM, y la CPH en concentraciones de 1 y 2mM, ambas comparadas con un control negativo conformado por H₂O destilada.

1. Evaluación de la genotoxicidad producida por MMC y CPH en el Cruce Estándar y Alta Bioactivación en el genotipo Trans-Heterocigoto (*mwh/flr³*)

En 20 alas observadas bajo el microscopio, los resultados obtenidos en el Cruce ST. para MMC, (Tabla 2,3,4 y 5. Gráfico 3) a la concentración de 0.025mM, mostraron un incremento significativo en la frecuencia de MSP/mosca que fue de 20.60, MSG/mosca 9.40 y MG/mosca 3.10, en comparación a 40 alas observadas para el Control Negativo cuyos resultados fueron menores, y a la concentración de 0.05mM se observó una frecuencia de 25.90 MSP/mosca, 11.50 MSG/mosca y 5.30 MG/mosca. En la CPH en cambio, se observó una frecuencia de MSP/mosca de 2.00 para 1mM y de 4.60 para 2mM, MSG/mosca de 0.60 para 1mM y de 1.10 para 2mM y MG/mosca de 0.20 y de 0.60 respectivamente.

En el cruce HB la frecuencia de manchas para el control negativo fue de 1.35 MSP/mosca, 0.10 MSG/mosca y 0.15 MG/mosca, estas frecuencias incrementaron significativamente en la MMC con 27.40 MSP/mosca, 14.10 MSG/mosca y 5.20 MG/mosca a la concentración de 0.025mM y con 25.70, 11.10 y 4.40 MSP, MSG y MG/mosca respectivamente a la concentración de 0.05mM. Sin embargo en la CPH estas sólo incrementaron a 4.80 MSP/mosca, 0.50 MSG/mosca y 0.10 MG/mosca a la concentración de 1mM y a 9.20, 1.00 y 0.50 MSP, MSG y MG/mosca respectivamente a la concentración de 2mM.

Tabla 1. Potencial Genotóxico de Mitomicina C mediante Cruce Estándar

Genotipos y Conc. (mg/ml)	N. de moscas (N)	Manchas por mosca (No. de manchas)			Análisis estadístico ^a		Total manchas <i>mwh</i> ^c (n)
		MSP (1-2 céls) ^b m = 2	MSG (>2 céls) ^b m = 5	MG	TM	m = 2	
<i>mwh/flr</i> ³							
Contr. Neg.	20	1,00 (20)	0,05 (01)	0,20 (04)	1,25 (25)		21
0.025 mM	10	20,60 (206) +	9,40 (94) +	3,10 (31) +	33,10 (331) +		288
0.05 mM	10	25,90 (259) +	11,50 (115) +	5,30 (53) +	42,70 (427) +		366
<i>mwh/TM3</i>							
Contr. Neg.	20	0,75 (15)	0,00 (00)		0,75 (15)		15
0.025 mM	10	6,30 (63) +	1,00 (10) +		7,30 (73) +		73
0.05 mM	10	7,90 (79) +	1,10 (11) +		9,00 (90) +		90

^aAnálisis estadístico de acuerdo con Frei y Würzler (1988): +, positivo; -, negativo; i, inconclusivo. *m*, factor de multiplicación a fin de evaluar los resultados significativamente negativos. Niveles de significancia $\alpha = \beta = 0,05$.

^bIncluso las manchas simples *flr*³ raras.

^cConsiderando los clones *mwh* para las manchas simples *mwh* y para las manchas gemelas.

^dApenas manchas simples *mwh* pueden ser observadas en los individuos heterocigotos *mwh/TM3*, ya que el cromosoma balaceador *TM3* no contiene el gen mutante *flr*³.

Tabla 2. Potencial Genotóxico de Mitomicina C mediante Cruce de Alta Bioactivación						
Genotipos y Conc. (mg/ml)	N. de moscas (N)	Manchas por mosca (No. de manchas) Análisis estadístico ^a			TM	Total manchas <i>mwh</i> ^c (n)
		MSP (1-2 céls) ^b m = 2	MSG (>2 céls) ^b m = 5	MG m = 5		
<i>mwh/flr</i> ³						
Contr. Neg.	20	1,35 (27)	0,10 (02)	0,15 (03)	1,60 (32)	27
0.025 mM	10	27,40 (274) +	14,10 (141) +	5,20 (52) +	46,70 (467) +	398
0.05 mM	10	25,70 (257) +	11,10 (111) +	4,40 (44) +	41,20 (412) +	324
<i>mwh/TM3</i>						
Contr. Neg.	20	1,35 (27)	0,05 (01)	d	1,40 (28)	28
0.025 mM	10	13,80 (138) +	3,10 (31) +		16,90 (169) +	169
0.05 mM	10	11,60 (116) +	4,10 (41) +		15,70 (157) +	157

^aAnálisis estadístico de acuerdo con Frei y Würzler (1988): +, positivo; -, negativo; i, inconclusivo. *m*, factor de multiplicación a fin de evaluar los resultados significativamente negativos. Niveles de significancia $\alpha = \beta = 0,05$.

^bIncluso las manchas simples *flr*³ raras.

^cConsiderando los clones *mwh* para las manchas simples *mwh* y para las manchas gemelas.

^dApenas manchas simples *mwh* pueden ser observadas en los individuos heterocigotos *mwh/TM3*, ya que el cromosoma balanceador *TM3* no contiene el gen mutante *flr*³.

Tabla 3. Potencial Genotóxico de Ciclofosfamida mediante Cruce Estándar

Genotipos y Conc. (mg/ml)	N. de moscas (N)	Manchas por mosca (No. de manchas)			Análisis estadístico ^a			Total manchas <i>mwh</i> ^c (n)
		MSP (1-2 céls) ^b m = 2	MSG (>2 céls) ^b m = 5	MG	TM	MG	TM	
<i>mwh/flr³</i>								
Contr. Neg.	20	1,00 (20)	0,05 (01)	0,20 (04)		1,25 (25)	21	
1 mM	10	2,00 (20) +	0,60 (06) +	0,20 (02) i		2,80 (28) +	26	
2mM	10	4,60 (46) +	1,10 (11) +	0,60 (06) i		6,30 (63) +	57	
<i>mwh/TM3</i>								
Contr. Neg.	20	0,75 (15)	0,00 (00)			0,75 (15)	15	
1 mM	10	0,70 (07) i	0,30 (03) +			1,00 (10) i	10	
2mM	10	1,60 (16) +	0,10 (01) i			1,70 (17) +	17	

^aAnálisis estadístico de acuerdo con Frei y Würzler (1988): +, positivo; -, negativo; i, inconclusivo. *m*, factor de multiplicación a fin de evaluar los resultados significativamente negativos. Niveles de significancia $\alpha = \beta = 0,05$.

^bIncluso las manchas simples *flr³* raras.

^cConsiderando los clones *mwh* para las manchas simples *mwh* y para las manchas gemelas.

^dApenas manchas simples *mwh* pueden ser observadas en los individuos heterocigotos *mwh/TM3*, ya que el cromosoma balaceador *TM3* no contiene el gen mutante *flr³*.

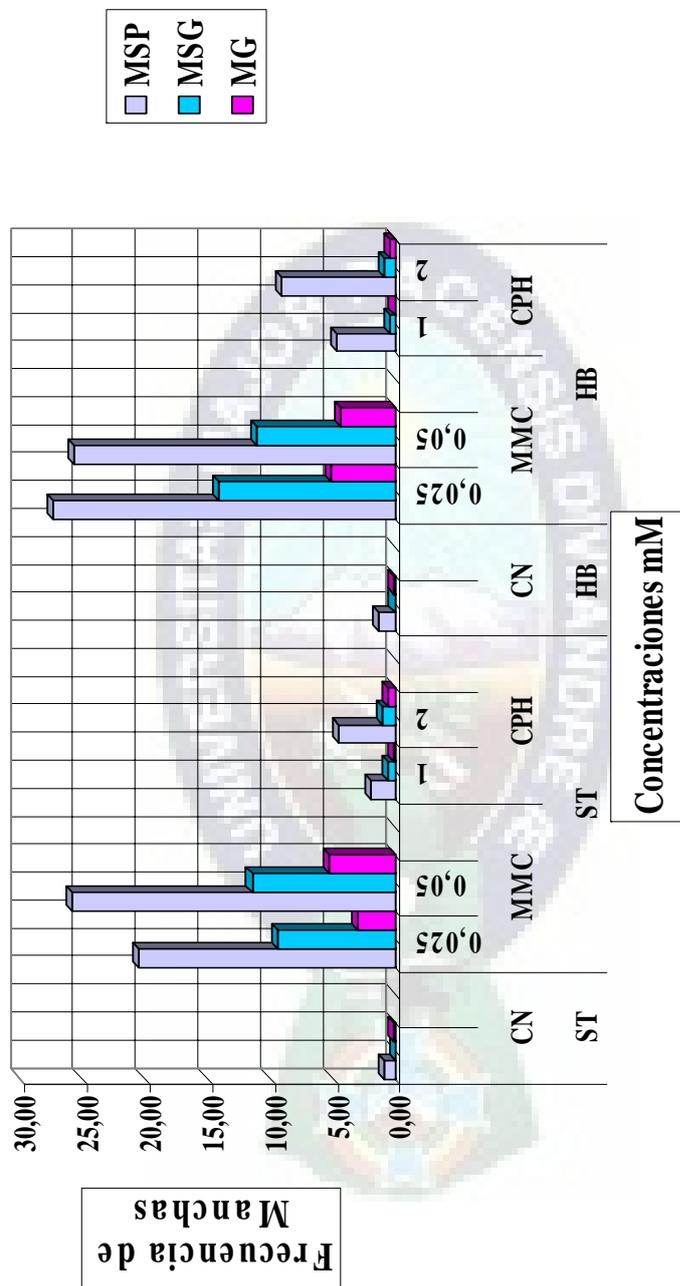
Tabla 4. Potencial Genotóxico de Ciclofosfámido mediante Cruce de Alta Bioactivación							
Genotipos y Conc. (mg/ml)	N. de moscas (N)	Manchas por mosca (No. de manchas)			Análisis estadístico ^a		Total manchas <i>mwh</i> ^c (n)
		MSP (1-2 céls) ^b m = 2	MSG (>2 céls) ^b m = 5	MG	TM		
<i>mwh/flr^s</i>							
Contr. Neg.	20	1,35 (27)	0,10 (02)	0,15 (03)	1,60 (32)	27	
1 mM	10	4,80 (48) +	0,50 (05) +	0,10 (01) i	5,40 (54) +	53	
2mM	10	9,20 (92) +	1,00 (10) +	0,50 (05) i	10,70 (107) +	102	
<i>mwh/TM3</i>							
Contr. Neg.	20	1,35 (27)	0,05 (01)	d	1,40 (28)	28	
1 mM	10	1,80 (18) i	0,50 (05) +		2,30 (23) i	23	
2mM	9	4,56 (41) +	0,33 (03) i		4,89 (44) +	44	

^aAnálisis estadístico de acuerdo con Frei y Würzler (1988): +, positivo; -, negativo; i, inconclusivo. *m*, factor de multiplicación a fin de evaluar los resultados significativamente negativos. Niveles de significancia $\alpha = \beta = 0,05$.

^bIncluso las manchas simples *flr^s* raras.

^cConsiderando los clones *mwh* para las manchas simples *mwh* y para las manchas gemelas.

^dApenas manchas simples *mwh* pueden ser observadas en los individuos heterocigotos *mwh/TM3*, ya que el cromosoma balaceador *TM3* no contiene el gen mutante *flr^s*.

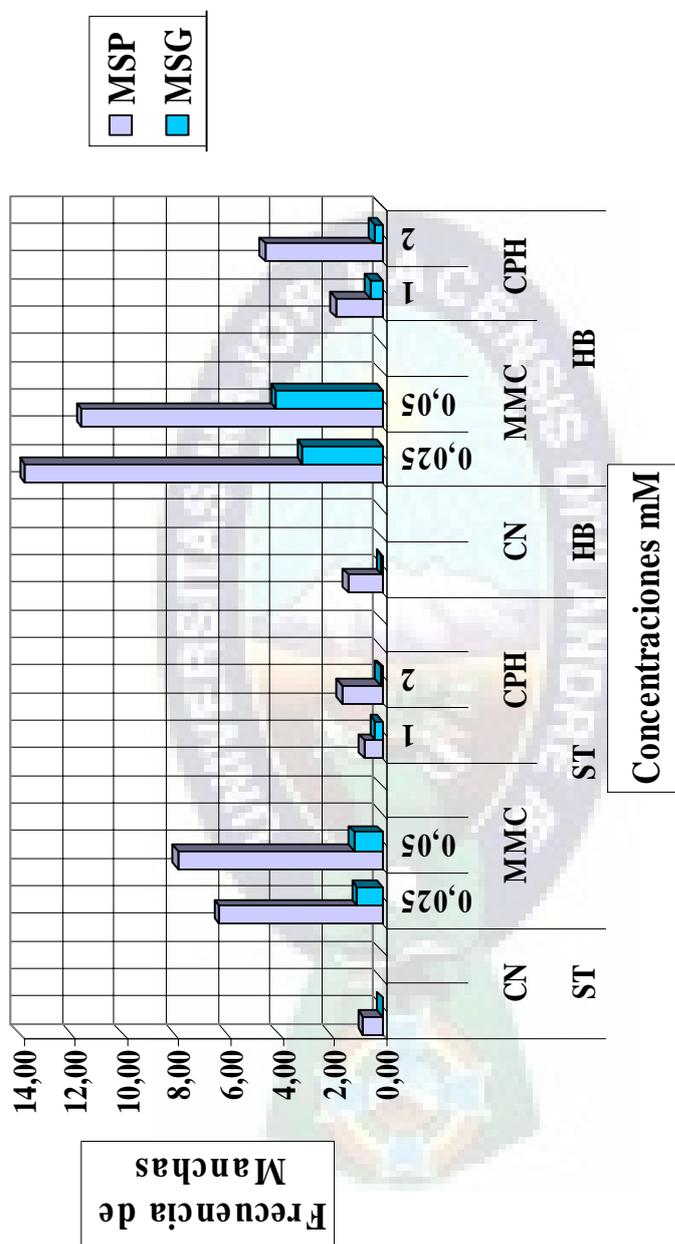


Graf.3 Frecuencia de Manchas producidas por MMC y CPH en el Cruce Estándar y Alta Bioactivación en el genotipo trans-heterocigoto (mwh/fir3)

2. Evaluación de la genotoxicidad producida por MMC y CPH en el Cruce Estándar y Alta Bioactivación en el genotipo Heterocigoto (mwh/TM3)

En los resultados obtenidos en el Cruce ST. para MMC, (Tabla 2,3,4 y 5. Grafico 4), se observó que a la concentración de 0.025mM la frecuencia de MSP/mosca aumentó a 6.30 y de MSG/mosca a 1.00 en comparación al Control Negativo. A la concentración de 0.05mM en cambio, se observó una frecuencia de 7.90 MSP/mosca y de 1.10 MSG/mosca. En la CPH las MSP/mosca presentaron una frecuencia de 0.70 a la concentración de 1mM y de 1.60 a la concentración de 2mM y las MSG una frecuencia de 0.30 para 1mM y 0.10 para 2mM.

En el cruce HB la frecuencia de manchas para el control negativo fue de 1.35 MSP/mosca y 0.05 MSG/mosca, estas incrementaron significativamente en la MMC a la concentración de 0.025mM con 13.80 MSP/mosca y 11.60 MSG/mosca y con 3.10 MSP/mosca y 4.10 MSG/mosca a la concentración de 0.05mM. En la CPH en cambio, estas aumentaron a 1.80 y 4.56 MSP/mosca a la concentración de 1mM y a 0.50 y 0.33 MSG/mosca a la concentración de 2mM.



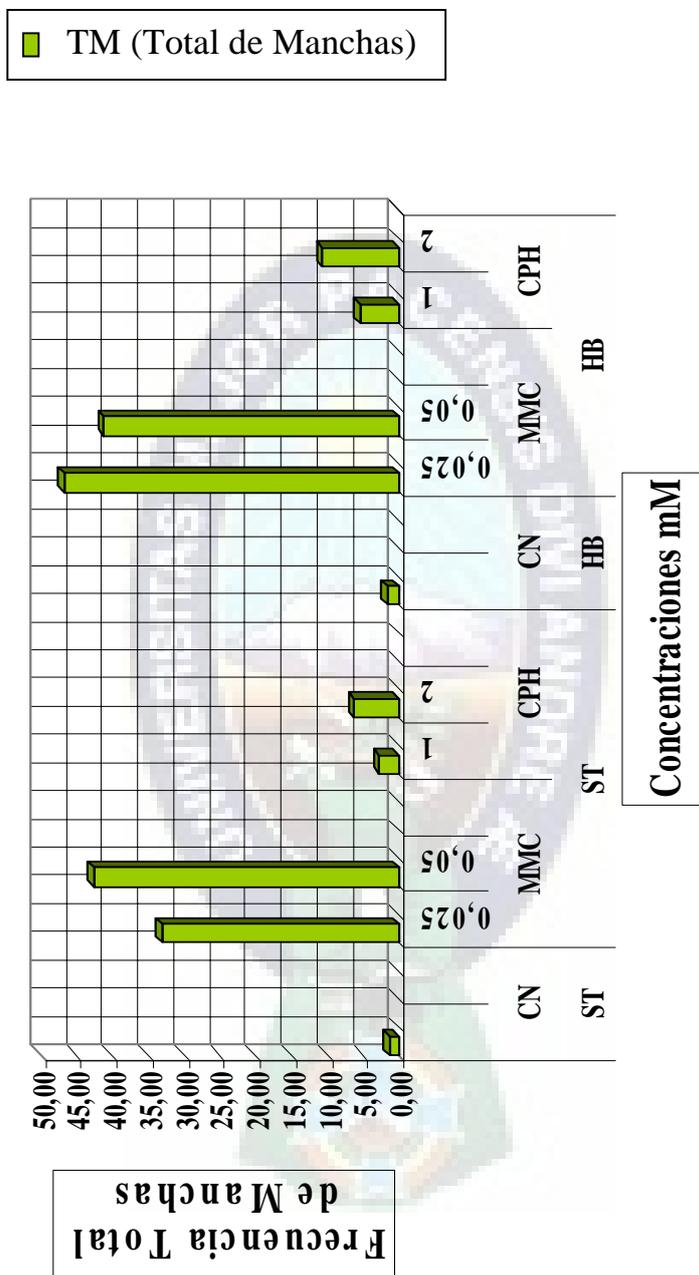
Graf.4 Frecuencia de Manchas producidas por MMC y CPH en el Cruce Estándar y Alta Bioactivación en el genotipo heterocigoto (mwh/TM3)

3. Comparación de la Frecuencia Total de Manchas producidas por MMC y CPH en ambos Cruces en el genotipo *mwh/flr³*

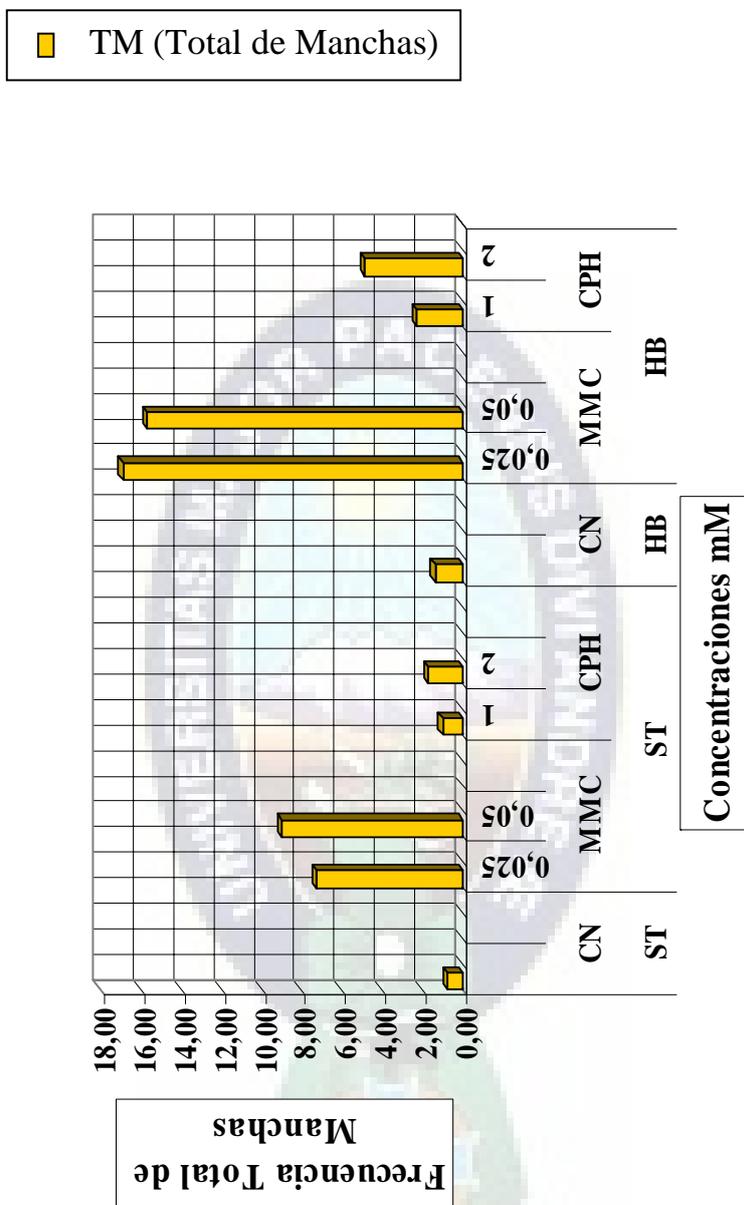
En el genotipo *mwh/flr³* (Tabla 1, 2, 3 y 4, Grafico 5), se observó que en la MMC a la concentración de 0.025mM la frecuencia total de manchas/mosca aumentó de 33,11 en el Cruce ST a 46.70 en el Cruce HB mientras que a la concentración de 0.05mM fue de 42.70 en el Cruce ST a 41.20 en el Cruce HB comparadas con las del control negativo que fueron menores. En la CPH en cambio, a la concentración de 1mM la frecuencia total de manchas para el Cruce ST fue de 2.80 y para el Cruce HB fue de 5.40, estas incrementaron a la concentración de 2mM a 6.30 en el Cruce ST y a 10.70 en el Cruce HB.

4. Comparación de la Frecuencia Total de Manchas producidas por MMC y CPH en ambos Cruces en el genotipo *mwh/TM3*

En el genotipo *mwh/TM3* (Tabla 1,2,3 y 4, Grafico 6), se observó que en la MMC la frecuencia total de manchas a la concentración de 0.025mM aumentó de 7.30 en el Cruce ST a 16.90 en el Cruce HB en cambio a la concentración de 0.05mM esta aumentó de 9.00 a 15.70 respectivamente. Comparadas con 0.75 en el Cruce ST y 1.40 en el Cruce HB del control negativo. En la CPH en cambio, a la concentración de 1mM la frecuencia total de manchas para el Cruce ST fue de 1.00 y para el Cruce HB fue de 2.30, estas incrementaron a la concentración de 2mM a 1.70 en el Cruce ST y a 4.89 en el Cruce HB.



Graf.5 Frecuencia Total de Manchas producidas por MMC y CPH en el Cruce Estándar y Alta Bioactivación en el genotipo Trans-heterocigoto (mw/hfir3)



Graf 6. Frecuencia Total de Manchas producidas por MMC y CPH en el Cruce Estándar y Alta Bioactivación en el genotipo Heterocigoto (mwh/TM3)

VI. DISCUSION

Diferentes agentes que ingresan al ser humano son sometidos a diario a distintos tipos de biotransformación de un sin fin de xenobióticos existentes en el medio ambiente o desarrollados por el hombre. Con ciertas especies de ratones, se ha podido demostrar como los diferentes tipos de metabolismo empleado para la biotransformación de esta variedad de xenobióticos, particularmente en la expresión de las enzimas de Citocromo P-450, pueden variar la susceptibilidad de muchas genotoxinas y carcinógenos (Galoway et al., 1980; Guengerich, 1988; Lush, 1981).

Esta variación en la bioactivación de dichas genotoxinas y carcinógenos, ha sido reconocida como un importante factor que debe ser tomado en consideración puesto que evalúa el riesgo genético o carcinogénico ocasionado en los individuos expuestos a estos compuestos químicos (Guengerich, 1988; Weber *et al.*, 1988).

Hoy en día, cuando se intenta evaluar la factibilidad de emplear la quimioprevención para reducir los efectos de mutágenos y carcinógenos, es de gran relevancia el empleo de pruebas cuantitativas y cualitativas que sean genéticamente susceptibles a xenobióticos específicos (Abraham and Graf, 1995).

Es así, que para la evaluación de la genotoxicidad de los anticancerígenos Mitomicina C (MMC) y Ciclofosfamida (CPH), se llevó a cabo la prueba de SMART donde se emplearon concentraciones de 0.025 y 0.05mM para MMC y de 1 y 2mM para CPH, dando como resultado final una actividad genotóxica por parte de ambos medicamentos. Las concentraciones empleadas en ambos casos se determinaron tomando en cuenta anteriores investigaciones realizadas por el mismo método (Spanó *et al.*, 2001; Abraham and Graf, 1995).

Los resultados observados con ambos anticancerígenos tanto en el Cruce Estándar como en el Cruce de Alta Bioactivación, han demostrado la capacidad que tienen estos compuestos para incrementar la frecuencia de manchas mutantes aunque con una potencia distinguible en la capacidad de generarlas. Estas observaciones, confirman y fortalecen reportes previos a cerca de la genotoxicidad causada por ambos medicamentos en *Drosophila melanogaster* siendo evidente la producción de mutaciones tanto génicas y cromosómicas como las generadas por recombinación mitótica por parte de la MMC y la CPH, ya que se ha obtenido una elevada expresión de MSP, MSG y MG.

Así por ejemplo, Spanó *et al.*, 2001 estudió la actividad recombinogénica del agente oxidante cromato de potasio y tres procarcinógenos: ciclofosfamida, p-dimetilaminoazobenceno y 9,10-dimetilantraceno, donde el cromato de potasio resultó ser altamente genotóxico en ambos cruces. Sorprendentemente, el promutágeno ciclofosfamida, demostró ser igualmente genotóxico para ambos cruces, mientras que el p-dimetilaminoazobenceno resultó negativo en el cruce Estándar y genotóxico en el de Alta Bioactivación. El 9,10-dimetilantraceno, mostró una débil genotoxicidad en el cruce de Alta Bioactivación. Sin embargo, los datos obtenidos de las manchas *mwh* en ambos genotipos demostraron que los 4 compuestos presentan actividad recombinogénica. Del mismo modo, Frei *et al.*, 1992, estudió la genotoxicidad del anticancerígeno mitoxantron el cual resultó ser claramente genotóxico debido a su inducción tanto de eventos ocasionados por recombinación mitótica como de eventos mutacionales (mutaciones génicas y cromosómicas). Por lo tanto estos trabajos respaldan los resultados obtenidos en esta investigación.

Además, este estudio ha demostrado la capacidad que tiene este ensayo *in vivo* para obtener resultados cualitativos y cuantitativos de los efectos genotóxicos producidos por estos medicamentos anticancerígenos como resultado de su bioactivación a través del enzima citocromo p-450.

Dado que la prueba de SMART ha demostrado ser capaz de detectar agentes alquilantes mono y bi-funcionales que requieran de varias rutas metabólicas para su activación (Graf *et al.*, 1984), la alta actividad observada en los resultados del experimento con la MMC en el Cruce Estándar, indica que la actividad metabólica necesaria para su activación está presente en suficiente cantidad en las larvas de este cruce (Abraham and Graf, 1995), lo que podría deberse a que este medicamento no solo posee una activación indirecta sino también una activación por otras vías, como se encontró en previas investigaciones donde Bachur *et al.*, 1979 propuso que los agentes quinónicos como es el caso de la MMC son activados a radicales libres no solo mediante la enzima cit. P-450 reductasa sino también mediante otro tipo de quinona-reductasa. Del mismo modo, Goodman and Gilman, 1998 indican que su activación en el organismo se da bien por reducción química espontánea o enzimática de la quinona.

En el caso del Cruce de Alta Bioactivación caracterizado por presentar niveles elevados de la enzima citocromo P-450, se ha demostrado una mayor sensibilidad a la actividad del anticancerígeno CPH comparada con la de MMC, puesto que los resultados obtenidos del total de manchas *mwh* en la CPH casi llegan a duplicarse en este cruce. Sin embargo, aunque los resultados encontrados en este trabajo demuestran similar potencia genotóxica que la obtenida por los investigadores Abraham and Graf, 1995, estos difieren en su sensibilidad hacia los cruces Estándar y Alta Bioactivación ya que dichos investigadores las encontraron igualmente genotóxicas en ambos cruces. Esto puede deberse a las condiciones experimentales o la fuente del medicamento, tal como se dio el caso con la MMC en 2 laboratorios diferentes donde los resultados obtenidos en uno de ellos llegó a duplicarse comparados con los resultados obtenidos en el otro laboratorio (Graf *et al.*, 1984).

Además, se sabe que la CPH se transforma en 4-hidroxiciclofosfamida y aldofosfamida mediante el cit. P-450, y que la aldofosfamida produce

espontáneamente acroleína y deja libre una mostaza fosforamida quien es responsable de su alta capacidad alquilante, lo que sugiere que la mayor producción de mutaciones evidentes en el cruce Alta Bioactivación se deben precisamente a la elevada cantidad de enzimas cit. P-450 (mayor a la basal) existentes en este cruce. Eventos similares postula Saner *et al.*, 1996, quien menciona que la alta toxicidad observada en las larvas del cruce Alta Bioactivación se debe muy probablemente a los niveles elevados de cit. P-450, especialmente cit. P-450 (6A2), en estos individuos lo que conllevaría al incremento en la producción de dichos metabolitos tóxicos.

Las frecuencias de las manchas *mwh* observadas en el genotipo *mwh/TM3* para ambos compuestos fueron considerablemente bajas comparadas con las del genotipo *mwh/flr³*, sin embargo estas se mantuvieron significantes con respecto a las observadas en el control negativo. Por lo tanto, si bien esta mayoría de manchas en el marcador genético *mwh/flr³* son debido a recombinación mitótica (Spanó *et al.*, 2001), un menor número pero significativo puede deberse a distintos eventos genéticos producidos por la pérdida de heterocigocidad. Rodríguez-Aranaiz *et al.*, 1996, analizó la recombinación mitótica inducida por diversos agentes alquilantes mono y bi-funcionales, entre los que la MMC obtuvo el tercer lugar con respecto a la inducción de manchas gemelas entre los 6 compuestos analizados determinando una actividad recombinogénica equivalente a un 73%. Holliday (1964), encontró que el tratamiento de *Ustilago* y *Saccharomyces* con agentes que inhiban la replicación del DNA como es el caso de la MMC resulta en un incremento de la recombinación somática. De modo similar, Suzuki (1965) encontró que la MMC aumenta la cantidad de entrecruzamientos en *Drosophila melanogaster*.

Por lo tanto, la diferencia entre los resultados obtenidos por los individuos del genotipo Trans-heterocigotos (*mwh/flr³*) y los individuos del genotipo Heterocigotos (*mwh/TM3*), permite cuantificar la real contribución de la actividad recombinogénica generada por un compuesto en estudio. La importancia de

determinar dicha cuantificación, radica en que la recombinación contribuye de manera significativa al origen del cáncer (Ribeiro and Rodríguez, 2002).

Por otro lado, las MSP también son el mayor resultado de estos promutágenos debido a que requieren de una previa metabolización lo que los lleva a producir daños genéticos tardíos (Graf *et al.*, 1984) ya que las mutaciones ocasionadas por estos compuestos se dan en las últimas divisiones mitóticas (Medina, 2000).

Un mutágeno potente puede ser analizado empleando un número pequeño de alas (10 o 20) (Graf *et al.*, 1984), y puede ser detectado en un tiempo aproximado de 10 días. Además, los diferentes tipos de manchas que estos producen nos dan a conocer los diferentes eventos genéticos como ser:

MSP y MSG: Ambos tipos de manchas pueden deberse a la pérdida de heterocigocidad producida por: a) Mutación Puntual, debido a un cambio de la región silvestre para el gen *mwh* por la expresión recesiva *mwh*. b) No disyunción, debido a una migración anormal de las cromátidas durante la división mitótica, lo que genera una célula hemicigota la cual expresa el gen recesivo que contenga. c) Deleción, debido a la pérdida de la región silvestre para el gen *mwh*, lo que lleva a su expresión.

MG: Generadas únicamente por recombinación entre el gen *flr³* y el centrómero, lo que lleva a que ambos marcadores se expresen de forma simultánea.

Por todo esto, la prueba de SMART considerado un método rápido, confiable y fácil de ejecutar, podría ser provechosamente empleado en el laboratorio de Farmacología de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas para el análisis genotóxico de diversos medicamentos y extractos de plantas.

VII. CONCLUSIONES

A travez de los ensayos realizados por la prueba de Mutación y Recombinación Somática (SMART), se ha llegado a las siguientes conclusiones:

- Los resultados de la evaluación de Mitomicina C y de Ciclofosfamida en el cruce Estándar, han demostrado que estos compuestos poseen una genotoxicidad significativa a niveles basales de la enzima citocromo P-450
- El aumento del daño genético causado por Mitomicina C y Ciclofosfamida en el cruce Alta Bioactivación comprueba que ambos compuestos son agentes promutágenos.
- La elevada cantidad de mutaciones producida por Mitomicina C en el cruce Estándar, se debe también a que esta posee una actividad metabólica de otro tipo, mientras que Ciclofosfamida al incrementar significativamente las mutaciones en el cruce Alta Bioactivación, confirma su biotransformación por vía indirecta.
- La relación de la mayor cantidad de manchas en el marcador genético Trans-heterocigoto (mwh/flr^3) indica la existencia de recombinación mitótica, sin embargo debido a que el número de manchas del marcador genético heterocigoto ($mwh/TM3$) fue significativo pero no superior al de mwh/flr , se confirmaría el potencial de las drogas para producir recombinación.

VIII. RECOMENDACIONES

- Debido al bajo costo, la sensibilidad y la importancia que tienen los análisis genotóxicos de una variedad de sustancias medicamentosas o no que llegan al ser humano, se ha visto ideal tomar en cuenta la prueba de Mutación y Recombinación Somática (SMART), para dichos análisis.
- Se sabe que existe una relación entre la actividad recombinogénica de distintos compuestos y la producción de cáncer (30 Cairns. 1981). Tomado en cuenta esto y considerando las ventajas que ofrece la técnica SMART, es recomendable emplear este método en búsqueda de efectos genotóxicos y recombinogénicos de distintos compuestos ya sean medicamentos o productos naturales.



IX. BIBLIOGRAFÍA

- 1.- Abraham, S.K. and Graf U. (1995). Protection by Coffee Against Somatic Genotoxicity in Drosophila: Role of Bioactivation Capacity. *Fd. Chem. Toxic.* 0278-6915(95)00087-9
- 2.- Bachur N. R., Gordon S. L., Gee M. V., Kon H. (1979). NADPH cytochrome P-450 reductase activation of quinone anticancer agents to free radicals. *Med. Csiencie.* Vol. **76**, No. **2**: 954-957
- 3.- Cairns J. (1981). The origin of human cancers. *Nature* **289**: 353-357
- 4.- Capdevila J., Harris R.C., Falck JR. (2002). Microsomal cytochrome P450 and eicosanoid metabolism. *Cell Mol Life Sci.* **59**: 780-9.
- 5.- Cascáles A. M. y Gómez-Lechón M. J. (2004). Citocromo P-450. INSTITUTO DE ESPAÑA, REAL ACADEMIA NACIONAL DE FARMACIA. Madrid-España. Pág: 29-37, 264, 366-369
- 6.- Ding X. and Kaminsky L.S. (2003). Human extrahepatic cytochromes p450: Function in xenobiotic metabolism and tissue-selective chemical toxicity in the respiratory and gastrointestinal tracts. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **43**: 149-73.
- 7.- Dorr R.T. and Fritz W. L. (1980). Cáncer Chemotherapy Hand Book. Editor – Elsevier. Pág. 22-27, 342-343.
- 8.- Flores J. (1998). Farmacología Humana. Tercera Edición. Barcelona – España. Pág. 76, 1039, 1042-1043, 1052

- 9.- Frei and Würgler F.E. (1988). Statistical methods to decide whether mutagenicity test data from *Drosophila* assays indicate a positive, negative, or inconclusive result. *Mutat. Res.* **203**: 297-308
- 10.- Frei H., Clemants J., Howe D. and Würgler F. E. (1992). The genotoxicity of the anti-cancer drug mitoxantrone in somatic and germ cells of *Drosophila melanogaster*. *Mutat Res.* **279**: 21-33
- 11.-Goeptar A.R., Sheerens H., Vermeulen N.P.E. (1995). Oxygen and xenobiotic reductase activities of cytochrome P450. *Crit RevToxico.* **25**: 25-65.
- 12.- Goodman and Gilman. Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica - Novena Edición. México. 1998. Pág: 1315-1316, 1347-1348
- 13.- Graf U., Würgle F.E., Katz A.J., Frei H., Juon H., Hall C.B. and Kale P.G. (1984). Somatic Mutation and Recombination Test in *Drosophila melanogaster*. *Environ Mutagen* **6**: 153-188
- 14.- Graf U., Frei H., Kägi A., Katz A.J. and Würgler F.E. (1989). Thirty compounds tested in the *Drosophila* wing spot test. *Mutat. Res.* **222**: 359-373
- 15.- Graf U, Spanó M, Guzman J, Suresh A and Andrade H H. (2000). The wing Somatic Mutation and Recombination Test (SMART) in *Drosophila melanogaster*: An efficient tool for the detection of genotoxic activity of pure compounds or complex mixtures as well as for studies on antigenotoxicity. African Newsletter.
- 16.- Graf U., Schaik van N., and Würgler F. E. (1992). *Drosophila* Genetics: A Practical Course. Pág. 3-13

- 17.- Guengerich P. (2001). Uncommon P450 catalysed reactions. *Curr Drug Metabolism*. **2**: 93-115.
- 18.- Gurtoo H.,L., Marinello A. J., Struck R. F., Brajeswar P., and Dahms R.P. (1981). Studies on the Mechanism of Denaturation of Cytochrome P-450 by Cyclophosphamide and its Metabolites. *J. Biol. Chem.* Vol. **256**, No **22**: 11691-11701
- 19.- He M., Sheldon P.J., and Sherman D. H. (2001). Characterization of a quinone reductase activity for the mitomycin C binding protein (MRD): Functional switching from a drug-activating enzyme to a drug-binding protein. *Proc Natl Acad Sci*. **30**; 98(3): 926–931.
- 20.-Hoffmann G.F. (1994). Induction of genetic recombination: consequences and model system. *Environ Mol Mutagen* **24**: 59-66.
- 21.- Hollenberg P.F. (1992). Mechanism of cytochrome p450 and peroxidase catalysed xenobiotic metabolism. *FASEB J*. **6**: 686-94.
- 22.- Holliday R. (1964). The induccion of mitotic recombination by mitomycin C in Ustilago and Saccharomyces. *Genetics* **50**: 323-335
- 23.- Iyanagi T. and Yamazaki T. (1969). One-electron-transfer reactions in biochemical systems. 3. One-electron reduction of quinones by microsomal flavin enzymes. *Biochim. Biophys.***172**: 370-381
- 24.- Jowett T., Farid W. Mustafa F., Oxtoby E. and Wolf R.C. (1991). Mammalian genes expressed in Drosophila: a transgenic model for the study of mechanisms of chemical mutagenesis and metabolism. *The EMBO J.* vol.**10** no.**5**: 1075-1081

- 25.- Lindsley D.L. and Zimm G.G. (1992). El genoma de *Drosophila melanogaster*. pp. 1621. Academic Press San Diego. CA. USA.
- 26.- Litter M. Compendio de Farmacología - Tercera edición. Buenos Aires-Argentina. 1984. Pág: 708, 726
- 27.- Nishibayashi H, Omura T. and Sato R. (1963). *Biochim. Biophys.* **67**: 520-522 Cit. en Bachur Nicholas R., Gordon Sandra L., Gee Malcolm V. and Kon Hideo. (1979). NADPH cytochrome P-450 Reductase activation of quinine anticancer agents to free radicals. *Med. Sci* Vol. **76**, No **2**: 954-957
- 28.- Omura T. (1999). Forty years of Cytochrome P450. *Biochem Biophys Res Commun* **266**: 690-8.
- 29.- Orellana B. M. y Guajardo T. V. (2006). Actividad del citocromo P450 y su alteración en diversas patologías. *Rev.Med.Chile.* **132**: 85-94
- 30.- Osaba L. (1995). Detección de actividad genotóxica mediante el ensayo de mutación y recombinación somática en alas de *Drosophila melanogaster*. Análisis de 14 plaguicidas. Universidad del País Vasco. Facultad de Ciencias . Dpto. de Biología Animal y Genética. Pág. 54
- 31.- Pillco T. A. (2003). Evaluación del Potencial Genotóxico de *Bacharis latifolia* (Especie vegetal empleada en la medicina tradicional boliviana). Tesis de Licenciatura. Facultad de Biología. Universidad Mayor de San Andrés.
- 32.- Ribeiro R. and Rodriguez H. (2002). Métodos para o diagnóstico da exposicao genotóxica ambiental e ocupacional. 1-500p.

- 33.- Rodríguez-Arnaiz R., Orozco P., Gaytán J.C., Graf U. (1996). Análisis of mitotic recombination induced by several mono-and bifunctional alkylating agents in the *Drosophila* wing-spot test. *Mutat. Res.* **351**: 133-145
- 34.- Saner C., Werbel B., Würigler F.E. and Sengstag C. (1996). Metabolism of promutagens catalized by *Drosophila melanogaster* cit. P450 (6A2) enzyme in *Environ. Mol. Mutagen.* **27**: 46-58
- 35.- Spanó M., Frei H., Würigler E., Graf U. (2001). Recombinagenic activity of four compounds in the standard and high bioactivation crosses of *Drosophila melanogaster* in the wing spot test. *Mutagen.* **16**: 385 – 394
- 36.- Suzuki D. T. (1963). Studies on the chemical nature of crossing over in *Drosophila melanogaster*. I.Preliminary results on the effects of actinomycin D. *Canad. J. Genet. Cytol.* **5**: 482-489 --- (1965) Effects of mitomycin C on crossing over in *Drosophila melanogaster*. *Genetics.* **51**; 635-640
- 37.- Vogel E.W., Graf U., Frei H.-J. and Nivard M.M.J. (1999). The results of Assays in *Drosophila* as Indicators of Exposure to Carcinogens. *Cancer. Res.* **46**: 427-467
- 38.- Winters D.K., Cederbaum A.I. (1993). Biochemistry of Cytochrome P450. In *Hepatic and bile secretion: Physiology and pathophysiology*. Edited by Tavaloni and PD Berk. Raven Press, Ltd., New York. Chapter **27**: 407-420.
- 39.- Las toxinas ambientales y la genética. Accedido el 23/05/06. Se encuentra en: <http://es.geocities.com/ecored2000/coctel.html>



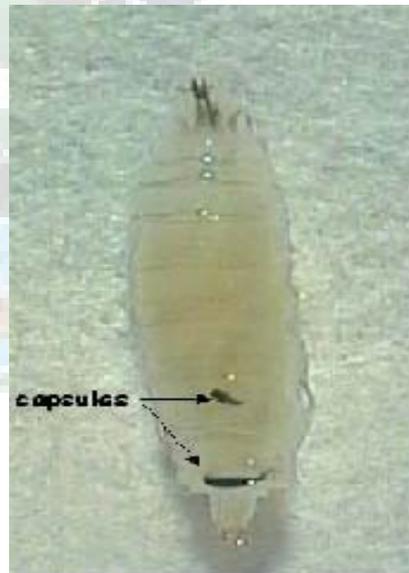
Anexo 1. Moscas eterizadas vista al Estéreo-Microscopio



Anexo 2. Moscas Eterizadas



Anexo 3. Drosophila melanogaster en medio de cultivo



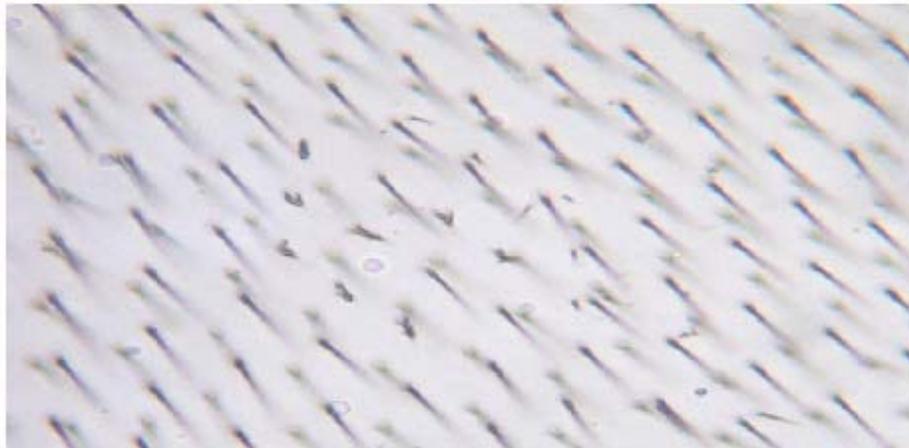
Anexo 4. Larva de Tercer Estadío



Anexo 5. Mancha Simple Grande – Marcador genético *mwh*

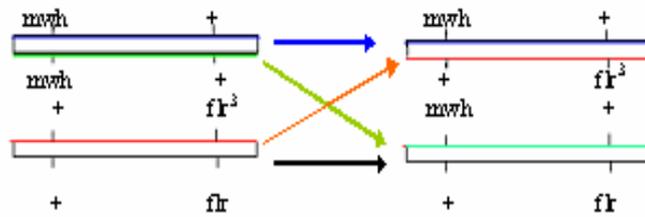


Anexo 6. Mancha Simple Grande – Marcador genético *flr³*

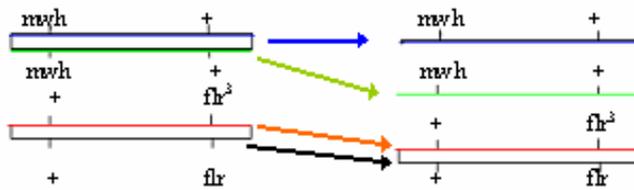


Anexo 7. Mancha Gemela – Marcador genético *mwh* y *flr³*

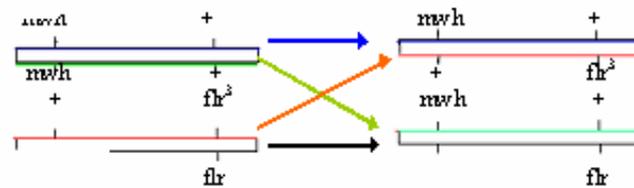
NORMAL



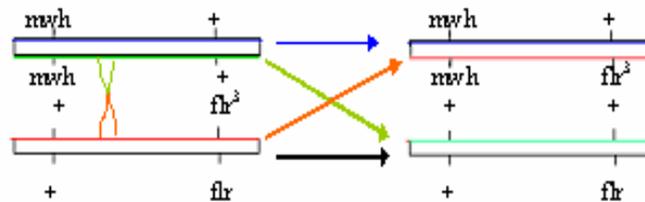
NO DEYUNCION



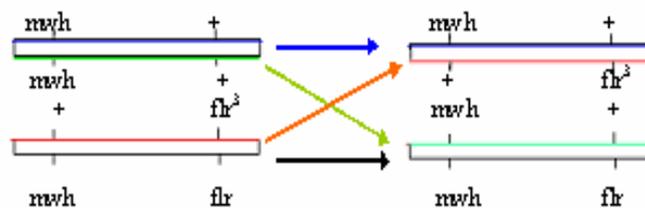
DELECIÓN



RECOMBINACION

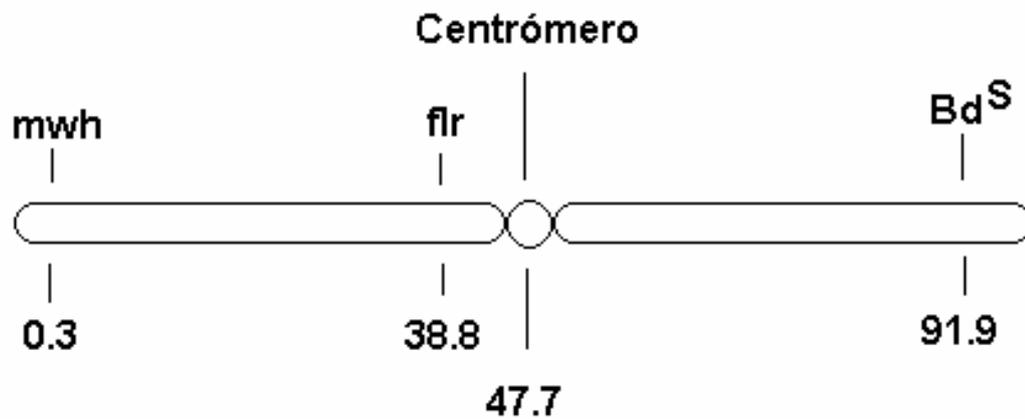


PUNTUAL

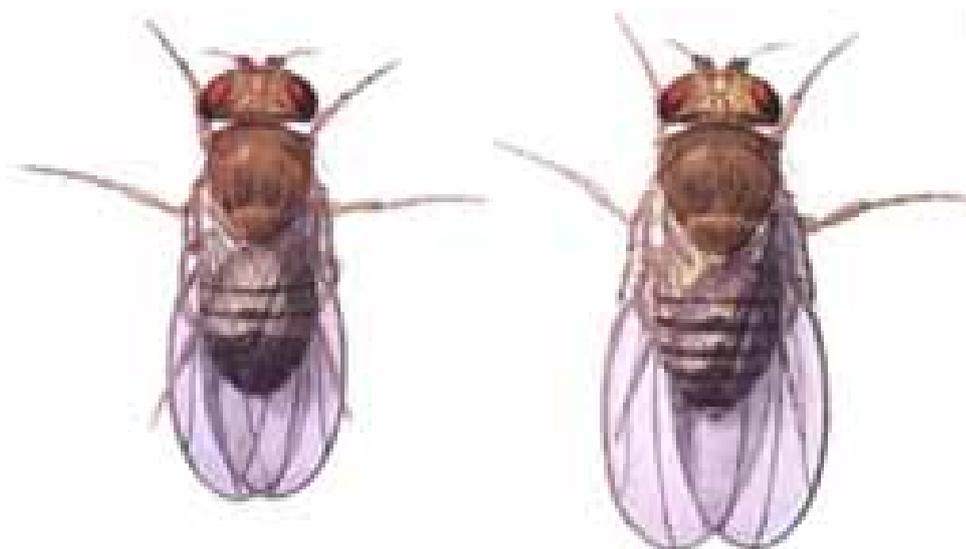


Anexo 8. Eventos genéticos producidos por la pérdida de heterocigidad en el cromosoma 3 de *Drosophila melanogaster*

MUTACIÓN	LOCALIZACIÓN	DESCUBRIDOR
<i>mwh</i>	3-0.3	Di Pasquale (1951)
<i>flr</i>	3-38.8	García-Bellido y Dapena (1974)
Centrómero	3-47.7	
Bd ^S	3-91.9	Spencer (1939)



Anexo. 9 Posición relativa de los marcadores utilizados a lo largo del cromosoma 3 (Tomado de Osaba, 1995)



CARACTERÍSTICA	HEMBRA	MACHO
Extremo del abdomen	alargado	redondeado
Aspecto del abdomen	abultado en la hembra gestante	sin abultamiento
Número de segmentos abdominales	7 segmentos visibles al microscopio	5 segmentos visibles al microscopio
Patas delanteras	no presenta peine sexual	presenta peine sexual (10 cerdas gruesas)

Anexo 10. Estructuras sexuales de *Drosophila melanogaster* que ayudan en el reconocimiento del sexo

GLOSARIO

Alopecia- Deficiencia natural o anormal del cabello o pelo.

Alquilante- Los agentes alquilantes son grupos mutagénicos químicos que ceden los grupos alquilo como CH_3 - O CH_3 - CH_2 a grupos amino o ceto de los nucleótidos.

Anafiláctico- Que produce anafilaxis.

Anafilaxis- Reacción de hipersensibilidad (alérgica) en la que anticuerpos IgE atacan a mastocitos y basófilos, que en respuesta producen mediadores de anafilaxia que causan un aumento de la permeabilidad de los vasos sanguíneos, un aumento de la contracción del músculo liso y un aumento de la producción de moco.

Aneuploidías- Que tiene un número de cromosomas que no es un múltiple exacto del haploide.

Bi-funcional- Agente alquilante que posee dos radicales libres que actúan como centros activos de interacción con el ADN.

Biotransformación- Es la transformación metabólica que en el organismo sufre la mayoría de los agentes xenobióticos.

Electrofílico- Reactivo que actúa como aceptor de un par de electrones de un átomo de carbono de una molécula orgánica, formando un nuevo enlace.

Endógenos- Originado dentro el organismo.

Enólico- Forma de un tautómero.

Estomatitis- Inflamación de la mucosa bucal.

Exógenos- Que se origina en el exterior del cuerpo; que es debido a una causa externa.

Extravasación- Salida de un líquido del vaso que lo contiene.

Fibrosis- Formación de tejido fibroso.

Genotóxico- Agente químico con capacidad de dañar el DNA o los cromosomas.

Hidrófilos- Que absorbe fácilmente la humedad.

Leucopenia- Reducción del número de leucocitos en la sangre por debajo de 5.000/mL.

Linfoma- Nombre genérico de los tumores originados en el tejido linfoide.

Lipófilas- Es el comportamiento de toda molécula que tiene afinidad por los lípidos.

Melanoma- Nombre genérico de los tumores malignos o pigmentados.

Metabolitos- Sustancia producida por el metabolismo.

Mielodepresión- Depresión de la médula ósea. Es la disminución de la capacidad de la médula ósea para la hematopoyesis o fabricación de células sanguíneas.

Mono-funcional- Agente alquilante que posee un radical libre que actúa como centro activo de interacción con el ADN.

Mutación- Alteraciones producidas en la estructura o en el número de los genes o cromosomas de un organismo vivo, que se transmiten a los descendientes por herencia.

Nucleofílico- son aquellas en las que la reacción se produce a través de moléculas que poseen un par de electrones disponibles (reactivos nucleófilos).

Promutágeno- Agente genotóxico que requiere de previa metabolización en el organismo.

Tautómero- Sustancia que presenta tautomería.

Tautomería- Transposición que consiste en la migración de un protón de un lugar a otro de una molécula, originando dos tautómeros que están en equilibrio y no se pueden aislar. Las reacciones de transposición o de reordenamiento consisten en cambios de estructura en una misma molécula, sin que haya ni salida ni entrada de nuevos átomos o grupos en la estructura.

Teratogénesis- Estudio de las condiciones de desarrollo de las monstruosidades.

Trombocitopenia- Disminución del número de plaquetas de la sangre

Xenobióticos- Compuesto externo a un organismo vivo que interacciona con él, generalmente a través de alteraciones metabólicas.