

DETECCIÓN DE LA DOSIS LETAL LD₅₀ DEL RED BULL EN *Drosophila melanogaster*.

María Fernanda Cervantes Gómez
Celia Guadalupe Rivera Morales
Asesor Biol. Laura Ivonne Herrera Reyes

Centro Universitario México
Laboratorio de Jóvenes hacia la Investigación

Ciencias Biológicas
Modalidad de Trabajo escolar (interna)

ANTECEDENTES

En los últimos años, han surgido distintas bebidas energizantes, estas bebidas son ampliamente comercializadas y han adquirido gran popularidad entre la población, principalmente en los jóvenes, quienes las usan ya sea para mantenerse despiertos o para mezclarlas con bebidas alcohólicas y para aumentar su estado de excitación. La bebida energizante más conocida en nuestro país es el Red Bull que contiene taurina, un aminoácido esencial del cual no se conocen los efectos en el cuerpo, glucuronolacton, cafeína, vitaminas, complejo B y carbohidratos. La ingesta de esta bebida puede ocasionar hipertensión arterial, taquicardia, arritmia cardiaca, alteraciones del estado de ánimo e hiperexcitabilidad. Esto nos llevo a pensar que si el Red Bull es una sustancia tóxica entonces alteraría el crecimiento de *Drosophila melanogaster*.

La mosca de la fruta *Drosophila melanogaster* pertenece al reino Animalia, filum Arthropoda, clase Insecta, orden Díptera, familia Drosophilidae, género *Drosophila* y Especie *melanogaster* (Audesirk, T. Audesirk, G. 1997) Es un organismo modelo que ha acompañado a los genetistas en el descubrimiento de diversos procesos y mecanismos biológicos; uno de los campos de investigación en que *Drosophila melanogaster* ha jugado un importante papel es en la genética toxicológica, disciplina que trata de conocer los efectos genotóxicos que se producen en los organismos cuando se exponen a compuestos tóxicos (Hallstrom, 1984). Entre las especies mutantes desarrolladas para la investigación hay dos de importancia extrema: *Oregon* (ORR (1)/ORR (2); *flr*³/Bd^S) y *flare* (*flr*³/Bd^S). La primera es una especie mutante DDT-RESISTENTE que muestra altos los niveles constitutivos de citocromo P450; la segunda *flare*, contiene niveles de citocromo P450 normales. (Castañeda, L., Muñoz, E.; Durán, A.; Heres, E.; Dueñas, I., 2001) El citocromo P450 se encuentra unido a la membrana del retículo endoplásmico,

obtiene sus equivalentes reducidos a partir de NADPH y está involucrado en el metabolismo de compuestos xenobióticos; constituye una de las más grandes familias de enzimas que se encuentran en todos los seres vivos desde bacterias hasta mamíferos (Neben, 1987; González *et al*, 1993). Son hemoproteínas que están involucradas tanto en metabolismo de compuestos endógenos, como las hormonas esteroideas y los ácidos grasos, y de compuestos exógenos como las drogas y los pesticidas, que generan reacciones que forman compuestos genobióticos mediados por los citocromos P450, incluye hidrólisis, oxidación y reducción introduciendo grupos funcionales a las moléculas haciéndolas hidrosolubles y más fácilmente excretables (González *et al.*;1993).

En la actualidad se conoce el número de citocromos P450 presentes en el genoma de la mosca de la fruta y del hombre; en el primero existen 90 secuencias P450 de las cuales 83 son genes y 7 son pseudogenes (reliquias evolutivas); en el segundo solo existen 50 genes. Al comparar las secuencias de genes de ambos se concluyó que algunas familias son exclusivas en ambos organismo. En particular la familia CYP1, involucrada en la transformación de los hidrocarburos aromaticos policíclicos (HAP) y de aminas aromáticas (AA), es característica en los humanos (Rodríguez-Arnaiz R, Vogel E. W. y Szakmary, A., 1993).

La LD₅₀, se define como la dosis a la que un compuesto produce la muerte del 50% de la población expuesta, siendo este valor virtual obtenido estadísticamente a partir de una curva dosis – respuesta. Para la determinación de la LD₅₀ se utilizó *Drosophila melanogaster*. (Orellana, M. Y Guajardo, V.2004)

PROPÓSITO

Comparar la LD50 en la población de *Drosophila melanogaster oregon* y *flare*³ cuando son alimentadas con una solución a diferentes concentraciones de Red Bull.

METODOLOGÍA

I. Obtención de *Drosophila melanogaster*: donadas por el Laboratorio de Genética Toxicológica de la FESI, UNAM; cepas Oregon y Flare³

II. Preparación del medio de cultivo: para ello se utilizó puré de papa en hojuelas en combinación con la solución A (solución bactericida y fungicida), preparada con 1000 ml de agua del grifo a la cual son añadidos 5 ml de una solución al 12 % de Nipagin, y 5 ml de una solución 10:1 de ácido propiónico. En frascos cremeros se pesaron 5 gramos de puré de papa en hojuelas y se añadieron 20 ml de la solución A.

III. Preparación de medio de reproducción: las moscas adulto que se quieren reproducir, se pasan a otros frascos con una capa de aproximadamente 5cm de levadura en barra con azúcar. Estos se guardan en la oscuridad por 8 horas a 25°C, para no ser molestados y los adultos son retirados, quedando los huevecillos en dicho medio.

IV. Conteo y separación de larvas: tres días después de retirar los adultos, la levadura se lava con agua corriente y se recuperan las larvas, seleccionando las larvas de tercer estadio para ser introducidas de 10 en 10 en los frascos con medio fresco.

V. Se prepararon 5 lotes por línea de *Drosophila*, el primero fue el grupo testigo y se alimento con hojuelas de papa y agua, el segundo grupo se alimento con pure de papa y 5 ml de una solución al 100% de Red Bull, el terecero 5ml al 75%, el cuarto grupo 5ml con una solución al 50%, el quinto 5 ml al 25% y el sexto 5ml al 12.5%, cada lote con 8 repeticiones.

VI. Después de diez días se contaron los sobrevivientes de cada frasco y se realizó el análisis estadístico.

RESULTADOS

En la tabla 1 se observa como a mayor concentración de Red Bull mayor índice de muerte en los individuos de *Drosophila melanogaster*.

También podemos apreciar la desviación estándar para cada uno de los lotes lo que nos permite calcular el grado de error en el experimento.

La LD₅₀ para la línea flare³ se presenta a por debajo de la concentración mínima, ya que se mueren más del 50% de individuos por concentración; de manera contraria la LD₅₀ de Oregon se encuentra por arriba de la

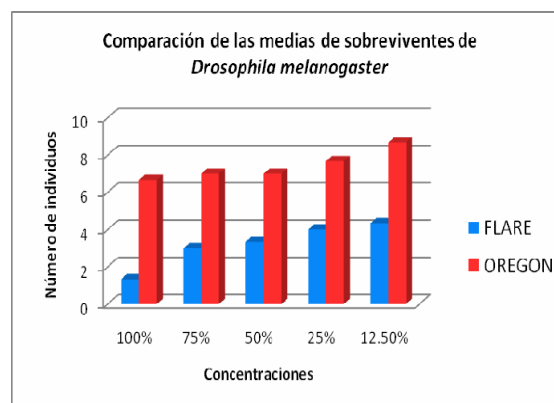
concentración máxima, es decir que se requiere más de una lata de Red Bull para afectar al 50% de la población.

Concentración	Media Oregon	D.E.	Media Flare ³	D.E.
100%	6.6	0.34	1.3	0.68
75%	7.0	0.59	3.0	0.59
50%	7.0	1.57	3.3	1.37
25%	7.6	0.90	4.0	1.02
12.5%	8.6	0.34	4.3	0.90

Tabla 1. Se observa el promedio (media) del número de sobrevivientes de ambas líneas de *Drosophila melanogaster* y la desviación estándar (D.E.) que indica el grado de error de cada concentración de Red Bull por línea.

La gráfica 1 muestra la comparación entre las medias de las dos líneas de moscas sometidas a las mismas concentraciones de Red Bull.

Se puede observar claramente como el nivel de sobrevivientes en la línea con mayor cantidad de citocromo P450 es más alto que en la línea con un nivel de citocromo normal, las medias poblacionales van desde un individuo sobreviviente por generación como flare³ hasta ocho sobrevivientes en el caso de Oregon.



Gráfica 1. Comparación entre las medias del número de individuos que sobrevivieron a la alimentación con distintas concentraciones de Red Bull

ANÁLISIS DE RESULTADOS Y CONCLUSIONES

Los resultados muestran que el nivel de sobrevivencia es más elevado en la línea Oregon que en la línea flare³, ya que la primera presenta una concentración más elevada del citocromo P450 lo que la hace más resistente a sustancias cancerígenas y mutagénicas.

En el caso del Red Bull la LD₅₀ o concentración letal a la que muere el 50% de la población se

encuentra entre el 12.5% y el 50% para la línea flare³, mientras que en la línea Oregon la LD₅₀ no aparece, es decir que se encuentra por arriba de la concentración máxima utilizada.

La línea Oregon es más resistente a los efectos genotóxicos por que puede contrarrestar la acción de las sustancias tóxicas contenidas en el Red Bull, mientras que flare³ si se ve afectada por la formación de compuestos xenobióticos.

La comparación de las medias, muestra como los organismos que fueron alimentados únicamente con hojuelas de papa y agua tuvieron un crecimiento normal y una media poblacional de 9.5 individuos por generación; mientras que las moscas alimentadas con hojuelas de papa y Red Bull presentaron resultados muy distintos.

Para la línea flare³ la media poblacional fue de 1.3 a una concentración de 100%, es decir que solo un individuo por generación sobrevivió; y de 4.3 a una concentración de 12.5%, es decir que la sustancia es tóxica aún ingiriendo el equivalente a una octava parte del contenido de la lata.

Para la línea Oregon la media poblacional estuvo entre 8.6 y 6.6 individuos sobrevivientes por generación, es decir, que la sustancia no resulto tan tóxica para estos individuos como para flare³, esto se explica por que esta línea tiene una mayor cantidad de citocromo P450.

Debemos mencionar que en ambas líneas las larvas si formaron las pupas, pero ya no eclosionaron de esta, es decir, la toxicidad de la sustancia tiene su punto de acción en el momento de la metamorfosis, por lo que las larvas no concluyen con su desarrollo.

El análisis estadístico revela en la prueba de Student que el análisis de varianza es menor a 1 por lo tanto se rechaza la hipótesis nula y se concluye que el Red Bull si tiene sustancias que afectan el desarrollo integral de *Drosophila melanogaster* y que los efectos que se presentan están ligados al tipo de organismo, a la sensibilidad, a la edad y al sexo.

La LD50 para organismos con una mayor concentración de citocromo P450 se encuentra por arriba del 100%, es decir la dosis que se requiere para afectar a un 50% de la población sobrepasa la concentración contenida en una lata de Red Bull.

La LD50 para organismos con concentraciones normales de citocromo P450 se encuentra a una concentración muy baja, por lo que el Red Bull resulta una sustancia altamente tóxica que puede

propiciar la formación de compuestos genobióticos altamente reactivos que interactúan con las biomoléculas y causan efectos tóxicos y genotóxicos en los individuos.

Considerando que las moscas tienen 83 genes que tienen secuencias para el citocromo P450 y los seres humanos únicamente tenemos 50 genes que transforman hidrocarburos y aminas aromáticos y que la mayoría de estos compuestos son promutagénicos muy reactivos, la interpolación de los resultados indica que debe ser restringido el consumo de Red Bull, sobre todo en adolescentes, ya que se encuentran en plena etapa de desarrollo y podrían presentar alteraciones en su salud y reproducción; incluso podrían ser los portadores de alelos recesivos para nuevas mutaciones letales en generaciones venideras.

Falta realizar la prueba de genotoxicidad SMART para conocer si se presentan mutaciones en las alas de estos individuos por la ingesta del Red Bull y si se presentan, poder deducir e inferir el comportamiento de dichas mutaciones en las nuevas generaciones.

REFERENCIAS

- Audesirk, T. y Audesirk, G. (1997), BIOLOGÍA. LA VIDA EN LA TIERRA. 4ª Ed. Prentice Hall. México. 388 pp.
- Cárdenas, S., Cerón, G. y Tavera, K. DETERMINACIÓN DE LA LD₅₀ DEL VERBASCOSIDO Y ÁCIDO CAFEICO EN *Drosophila melanogaster*, (Oregon flare y flr³)
- Castañeda, L., Muñoz, E.; Durán, A.; Heres, E.; Dueñas, I. (2001). LD₅₀ IN *Drosophila melanogaster* FED ON LEAD NITRATE AND LEAD ACETATE. Dros. Inf. Serv. 78: 160.
- Dueñas, I.; Heres, E.; Castañeda, L. and Graf, U; (2002). EASY RAISING OF *Drosophila melanogaster* ON A MEDIUM CONSISTING OF MASHED POTATO FLAKES AND A PRESERVATIVE SOLUTION.
- Dunkov B, Rodríguez-Arnaiz R., Pittendrigh B., French-Constant R. y Feyereisen R. (1996), "CYTOCHROME P450 GENE CLUSTERS IN DROSOPHILA MELANOGASTER". Mol. Gen. 251: 290-297
- Feyereisen, R. (1999), INSECT P450 ENZYMES. Annu. Rev. Entomol 44: 507-533
- González, FJ, Liu SY y Yano M (1993), REGULATION OF P450 GENES-MOLECULAR MECHANISMS, Pharmacogenesis 3:51-57
- Nebert, D. (1987), P450 GENES: STRUCTURE, EVOLUTION AND REGULATION. Ann. Rev. Biochem 56: 945-993
- Omara, T. y Sarlo, R. (1964), THE CARBON MONODIOXIDE-BINDING PIGMENT OF LIVER MICROSOMES. I. EVIDENCE FOR ITS HEMOPROTEIN NATURE". J. Biol. Chem 239: 2370-2378
- Orellana, M. Y Guajardo, V. ACTIVIDAD DEL CITOCROMO P450 Y SU ALTERACIÓN EN DIVERSAS PATOLOGÍAS. Rev. méd. Chile, ene. 2004, vol.132, no.1, p.85-94. ISSN 0034-9887.
- Ramos, P. (1993). MANUAL DE LABORATORIO DE GENÉTICA PARA *Drosophila melanogaster*. Mc Graw-hill. México. 1-9, 18- 24 pp.
- Rodríguez-Arnaiz R, Vogel E. W. y Szakmary A. (1993), STRONG INTRA-SPECIES VARIABILITY IN THE METABOLIC CONVERSION OF SIX PROCARCINOGENS TO SOMATIC CELL RECOMBINAGENS IN *Drosophila*. Mutagenesis 8: 543-551
- www.iztacala.unam.mx/temas/foropaea/13TB02la.htm, 26 de febrero de 2008 3:25 pm