



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

120
2ej.

FACULTAD DE CIENCIAS

CARACTERIZACION DEL POTENCIAL GENOTOXICO
Y PROTECTOR DE Ipomoea orizabensis EN CELULAS
SOMATICAS DE Drosophila melanogaster

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

B I O L O G O

P R E S E N T A :

JOSE ARMANDO MUÑOZ MOYA

DIRECTOR DE TESIS: DRA. PATRICIA RAMOS MORALES

MEXICO, D. F.



1994

FACULTAD DE CIENCIAS
DIRECCION ESCUELAS

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

ESTE TRABAJO DE TESIS SE REALIZO EN EL LABORATORIO DE GENETICA

"THEODOSIUS DOBIHANSKY"

DE LA FACULTAD DE CIENCIAS

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

CIUDAD UNIVERSITARIA



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS
División de Estudios
Profesionales
Exp. Núm. 55

M. EN C. VIRGINIA ABRIN BATULE
Jefe de la División de Estudios Profesionales
Universidad Nacional Autónoma de México.
P r e s e n t e .

Por medio de la presente, nos permitimos informar a Usted, que habiendo
revisado el trabajo de tesis que realiz ó el pasante _____

Muñoz Moya José Armando

con número de cuenta 8852700-0 con el título: _____

"Caracterización del Potencial Genotóxico y Protector de Ipomea
orizabensis en Células Somáticas de Drosophila melanogaster"

Consideramos que reunes los méritos necesarios para que pueda conti-
nuar el trámite de su Examen Profesional para obtener el título de -
Biólogo .

GRADO NOMBRE Y APELLIDOS COMPLETOS

Dra. Patricia Ramos Morales

Director de Tesis

Dra. Rosario Rodríguez Arnaiz

Dra. María Cristina Pérez-Amador Barrón

Bíol. Bertha Molina Alvarez

Suplente

Dr. René Cárdenas Vázquez

Suplente

FIRMA

[Firma manuscrita]
[Firma manuscrita]
[Firma manuscrita]
[Firma manuscrita]

Ciudad Universitaria, D.F., a 15 de junio

de 1994

AGRADECIMIENTOS

A mi asesora Dr. Patricia Ramos Morales por su atención, paciencia, apoyo y estímulo durante la realización de este trabajo.

A los sinodales:

Dra. Rosario Rodríguez Arnaiz
Dra. Cristina Pérez-Amador Barron
Bíol. Bertha Molina Alvarez

Por comentarios y consejos tan valiosos en la revisión de este trabajo.

A todos los compañeros del laboratorio de Genética de la facultad de Ciencias : Juan Carlos, Paty Orozco, Edna, Adriana, Lupita, Yolanda, Irma, Ma. de Jesús y en especial a Héctor y Julián por su apoyo en la parte de computación.

A todos los cuates de la generación especialmente a:

Toño, Eyra, Javier, Héctor,

Luis fernando, Jaime, Armando C., Adriana G.,

Lorena, Carlos S., Juan Carlos, Lalo, Concha,

Alicia, Víctor, Carlos Alvarez.

Rocío y Claudia

A los compañeros del museo:

Laura, Esteban, Paty, Elena,

Hortencia, Raquel, Javier,

Monica, Jorge, Daniel, Sergio,

Veronica, Lorena.

DEDICATORIAS

A mis padres:

Agustina Moya de Muñoz

Fernando Muñoz Hernández

A mis hermanos:

Daniel, Antonio

Jorge, Ma. Guadalupe

Me han dado su cariño, apoyo, y confianza en las buenas y en las malas les ofresco este pequeño regalo y espero que no sea el último.

INDICE

| | |
|-------------------------|----|
| RESUMEN..... | 11 |
| INTRODUCCION..... | 1 |
| MATERIAL Y METODOS..... | 26 |
| RESULTADOS..... | 37 |
| DISCUSION..... | 47 |
| CONCLUSIONES..... | 55 |
| REFERENCIAS..... | 56 |

RESUMEN

En México hay una gran diversidad de plantas de uso etnobotánico y medicinal. Una de estas plantas es *Ipomoea orizabensis*, conocida vulgarmente como raíz escamonea de México ó Jalapa de Orizaba; se utiliza principalmente como un purgante enérgico. En el presente trabajo se evaluó el efecto genotóxico y protector de la resina de la raíz de *Ipomoea orizabensis* sobre la genotoxicidad de la N-Nitrosodimetilamina (DMN), mediante la prueba de mutación y recombinación somática (SMART) en células del ala de *Drosophila melanogaster*.

Se trataron larvas transheterocigóticas flr3 +/- mwh y se realizaron dos tipos de protocolos:

1) Se expusieron larvas de 24 ± 4 horas a un primer tratamiento de 48 horas (crónico) con la solución de la resina y un segundo tratamiento de 6 horas (agudo) con el mutágeno de referencia, para una exposición total de 24 X 48 X 6 h.

2) En éste protocolo se invirtió el orden de los tratamientos: primero el agudo y después el crónico, para una exposición total de 72 X 6 X 48 h.

Se corrieron los testigos concurrentes respectivos, tanto negativos (sacarosa al 5 %; Tween 80, 1 %; DMSO, 1.5 %) como positivos con el mutágeno de referencia (DMN, 925 ppm).

Las concentraciones de la resina de *I. orizabensis* utilizadas en ambos protocolos fueron 2500, 3750, 4375, 5000 y 6250 ppm.

Se cuantificaron la cantidad y la frecuencia de manchas sencillas (chicas y grandes), gemelas y totales en cada uno de los lotes experimentales y testigos. La resina de raíz de *I. orizabensis* tiene mayor capacidad protectora cuando se administra previa a la DMN. Siendo menos efectivo el segundo protocolo ya que para manchas gemelas en la concentración de 2500 no hay tal efecto protector.

La resina de *I. orizabensis* administrada en dos diferentes edades larvarias no resultó genotóxica para *Drosophila melanogaster*.

De igual manera el presente trabajo también muestra la utilidad de la prueba de mutación y recombinación somática para detectar compuestos con actividad protectora y genotóxica y analizar las interacciones entre varias sustancias de interés.

INTRODUCCION

La diversidad de la flora en México es de las más ricas a nivel mundial, siendo un país más pequeño que muchos otros, es de los que más especies de plantas tiene. Esto se debe a la historia del continente. En el pasado, durante muchos miles de años, Sudamérica y Norteamérica estuvieron separadas, no existía el puente centroamericano que hoy los une. Sudamérica era un inmenso continente, aislado de los otros donde prosperó una flora característica, diversa y abundante, conocida como Neotropical. Norteamérica en cambio, estuvo unida a Europa y el norte de Asia donde también prosperó una biota propia, típica de la región, conocida como Holártica. Cuando Norteamérica se separó de Europa y surgió el puente centroamericano, muchas especies migraron de un lado a otro. La zona de transición se convirtió en una región extraordinariamente rica en especies; esta región es México (Krebs, 1985; Rzedowski, 1988; Hengevel, 1989).

Nuestro país, con una orografía variada, dió albergue en sus sierras, montañas y picos a la flora del norte, de carácter templado o frío; en sus planicies costeras y trópicos albergó a las especies del sur, de carácter cálido. Por otro lado, nuestro país comprende en más del 50 % de su territorio una zona conocida como desierto. En ella también prosperó una flora típica, conocida como Xerofítica, que tiene especies con adaptaciones para sobrevivir en este clima, seco y extremoso, por ejemplo los agáves y los cactus (Krebs, 1985; Rzedowski, 1988; Hengevel, 1989).

Así en México coexisten tres tipos de biotas. Esta mezcla

explica en gran medida, la extraordinaria diversidad biológica de nuestro país; el conocimiento profundo que los numerosos grupos étnicos de México tienen de su flora local, constituye uno de los principales legados de nuestro pasado indígena. Parte relevante de dicha flora son las plantas medicinales, que han sido utilizadas tradicionalmente para aliviar los problemas de salud de un sector importante de la población, aún en aquellas zonas donde la medicina social no ha penetrado (Del Amo, 1979).

En el curso de la historia la medicina herbolaria ha ofrecido diversas formas de mejorar el ánimo, consolar, calmar, dar fortaleza, serenar la mente y las emociones, pero también ha controlado afecciones físicas como las infecciones, inflamación, el vómito, la fiebre, el dolor y otros más. Por medio de aciertos y errores se aprendió que las plantas curaban, este conocimiento se transmitió de generación en generación y se incrementó con la experiencia. La recopilación de la información relacionada con el uso empírico de las plantas con acción medicinal cobra gran importancia, porque promueve la conservación y el uso racional de ejemplares útiles, y aún de otros que se encuentran en peligro de extinción (Del Amo, 1979).

El valor medicinal de la planta curativa está asociado a la presencia de sustancias químicas llamadas Principios Activos los cuales tienen acción terapéutica definida y pueden emplearse para modificar favorablemente los trastornos patológicos originados por la enfermedad (Cabrera, 1975). En medicina natural es importante conocer la distribución de los principios activos en la planta,

para lograr la medicación adecuada (Cabrera, 1975; Hernández y Gally, 1981; Alvarez, 1986). La tabla I muestra un ejemplo de la localización de los principios activos de acción terapéutica y los usos, del tomillo.

Muchos de los principios activos son sumamente complejos y de algunos aún se desconoce la naturaleza química; otros han sido aislados, purificados, e incluso, sintetizados o imitados. Por lo general, pertenecen a una de estas seis categorías: alcaloides, glucósidos, aceites esenciales, gomas y resinas, aceites grasos, y sustancias antibióticas (Thomson, 1980).

Los alcaloides forman un grupo diverso de compuestos alcalinos con marcada actividad fisiológica; su estructura anular es generalmente compleja y siempre contiene nitrógeno. Entre éstos se encuentran la morfina, la cocaína, la nicotina y la quinina; y otros 5500 más. Más del 90 % de los alcaloides se encuentran en las plantas con flores.

Las familias de plantas con mayor contenido de alcaloides son: Apocynaceae, Solanaceae, Rubiaceae, Liliaceae, Umbelliferae, y sobre todo, la Asclepiadaceae, que contienen el 18 % de todos los alcaloides conocidos. Los géneros más ricos son Nicotiana, Vinca (fuente de vincristina y vinblastina, dos compuestos que se emplean en la terapia contra la leucemia), Strychnos. Las especies más ricas incluyen la adormidera, Papaver somniferum (fuente del opio) con 25 alcaloides, y Rauwolfia serpentina (fuente del hipotensor y tranquilizante reserpina), con aproximadamente 30 (Thomson, 1980; Evans, 1991).

Tabla I. Composición química y usos del tomillo (*Thymus vulgaris*), "Menta de Campo" (Cabrera, 1975; Hernández y Gally, 1981; Álvarez, 1986).

| Estrato | Composición química | Usos |
|-----------------|---|--|
| Planta completa | Esencias aromatizantes: <ul style="list-style-type: none"> • fenoles (carvacrol, timol y p-cimol), • hidrocarburos monoterpénicos y sesquiterpenos, • aceites esenciales | Condimento, Propiedades: <ul style="list-style-type: none"> • antisépticas, antitusígenas y expectorantes, • excita la secreción de saliva, digestivo, calma los cólicos y • coadyuvante en el tratamiento de la gastroenteritis, antihelmíntico |
| Hojas | Flavonoides | Antiespasmódico |
| Flores | Aceites esenciales | Tónico estomacal |
| Raíz | Fenoles | Dolor de encías y muelas |

Los glucósidos son compuestos que, cuando están hidrolizados, producen un componente de uno o varios azúcares (por ejemplo el glucón), y uno sin azúcar (aglucon). Hay muchas variedades de glucósidos, clasificados según el tipo de aglucon. Entre los más importantes para la medicina moderna están los glucósidos cardíacos (presentes en las familias Asclepiadaceae, Liliaceae, Moraceae, Apocynaceae, Convolvulaceae, Escrofulareaceae). La digitalis, una de las drogas de origen vegetal más prescrita, es un glucósido que se emplea para combatir problemas cardíacos. Los glucósidos cianógenos que producen ácido cianhídrico, también han sido localizados en cerca de 2 mil especies, de 112 familias de angiospermas. Recientemente se han encontrado saponinas esteroidales (en las familias Solaneceae y Liliaceae) (Thomson, 1980; Evans, 1991).

Los aceites esenciales tienen, por lo general, varios componentes químicos, usualmente derivados terpénicos, o de compuestos aromáticos. Rara vez consisten en un solo componente, a menudo contienen alcoholes, cetonas, aldehídos, fenoles, éteres, ésteres y otros compuestos; ocasionalmente, nitrógeno y azufre. Muchos son germicidas potentes; esta propiedad está asociada con su volatilidad y capacidad para penetrar al citoplasma, sin embargo, al ser insolubles en agua, su uso se restringe como antisépticos en medicina. Son valiosos como carminativos, antitusígenos, antisépticos bucales, para hacer gargarismos, pulverizaciones y ungüentos (Thomson, 1980; Evans, 1991).

Las gomas son polímeros viscosos poco frecuentes en las

plantas, y las resinas son viscosas con brillo característico insolubles en agua y son productos de la oxidación de los aceites esenciales; ambos se utilizan como purgantes y ungüentos (Thomson, 1980; Evans, 1991).

Los aceites grasos, o lípidos -ésteres de ácidos grasos- se emplean en emulsiones y como purgantes.

Las sustancias antibióticas son compuestos orgánicos, capaces, en pequeñas cantidades, de inhibir procesos vitales de microorganismos (Thomson, 1991).

En efecto, los alcaloides y los glucósidos, obran generalmente sobre las funciones orgánicas como la circulación, la respiración, y otros; o bien, sobre el sistema nervioso y entonces su acción es más amplia y generalizada en el organismo. Los alcaloides suelen ser efectivos aun en dosis muy bajas, se puede decir que hay pocos venenos minerales que ejerzan una acción tóxica tan rápida como la de muchos alcaloides, así la digitalina, la eserina, la aconitina, paralizan las funciones orgánicas en dosis pequeñísimas. De allí el riesgo de emplear una planta empíricamente, y eso indica también la dificultad del estudio de las propiedades terapéuticas de la flora (Cabrera, 1975).

Además de los glucósidos y alcaloides, las plantas contienen sales minerales que ejercen una acción enérgica, y más activa que si se emplearan las mismas sales obtenidas por procedimientos químicos. Esta forma diferente de acción, parece ser debida a que en la planta viva, los iones de esas sales parecen encontrarse, en estados coloidales con cargas eléctricas que provocan equilibrios

fácilmente disociables, y que al ser introducidos en otro organismo reaccionan no sólo por acción química sino también por acción biológica. De allí la ventaja de emplear de preferencia plantas frescas. La desecación provoca la pérdida de actividad; por ejemplo las que tienen aceites esenciales, en las que con el tiempo la esencia se volatiliza perdiendo sus propiedades, o disminuyendo su potencia (Cabrera, 1975).

Se han aislado más de 12000 metabolitos secundarios orgánicos, muchos de ellos han resultado útiles en medicina pero, si se utilizan sin control, su uso puede ser contraproducente, al producir efectos colaterales indeseables y aún, ser mutagénicos, carcinogénicos o bien, teratogénicos. Un factor de importancia en esta práctica es que, en la mayor parte de los casos ocurre sin dosificación específica, ni vigilancia médica (Tabla II). Por lo anterior se deben conocer también las propiedades de sus componentes individualizados y de las interacciones entre éstos, que posean por ejemplo, propiedades anticancerosas, hipertensoras y antimicrobianas demostrables (Thomson, 1980).

Por otro lado, la exposición de los seres vivos a agentes químicos potencialmente reactivos presentes en el ambiente es frecuente. Se calcula que más de 100,000 productos químicos han sido elaborados para uso comercial e industrial, por ejemplo: aditivos de alimentos, cosméticos, medicamentos, pesticidas y muchos otros mas (De Serres, 1979). Cada año entran al mercado entre 500 a 1000 productos nuevos (Albert, 1988). Muchos de éstos son capaces de provocar daño con efectos a corto, mediano y largo

Tabla II. Efectos colaterales producidos por los componentes activos de algunas plantas medicinales (Evans, 1991).

| Género y especie | Componentes | Efectos |
|-----------------------|---|--|
| <u>Senecio</u> spp | Alcaloides pirrolizidínicos: lasiocarpina, retrorsina | Posibles teratógenos en ratas y, en vacas, muertes <u>in útero</u> |
| <u>Indigofera</u> spp | Indospicina | Fisura palatina y mortalidad en embrión de rata. Teratogénico |

| Género y especie | Propiedades y acción | Aplicaciones |
|-----------------------------|---|---|
| <u>Senecio scandes</u> | Baja la fiebre y protege la vista | Malaria, conjuntivitis aguda, disenteria, y enteritis |
| <u>Indigofera tinctoria</u> | Baja la temperatura, disipa la depresión, desinflamatorio | Laringitis, paperas, inflamaciones, sarna, sarpullido |

plazo. En la tabla III se muestra una clasificación de mutágenos ambientales propuesta por Moutschen (1985).

La mayoría de los compuestos químicos exhiben su actividad al interactuar con el DNA y producir así daño genético. La inducción de mutaciones génicas y aberraciones cromosómicas puede ocurrir en

Tabla III. Clasificación de mutágenos ambientales (Moutschen, 1985)

Grupo I.- Sustancias mutagénicas sintetizadas por el hombre y usadas directamente en condiciones específicas.

| Farmacéuticas | Plaguicidas | Aditivos |
|--|--|----------------------------------|
| Agentes antitumorales Narcóticos Anticonceptivos Excipientes Anestésicos | Insecticidas Herbicidas Raticidas Fungicidas Moluscicidas Nematicidas | Alimentos Cosméticos Otros |

Grupo II.- Sustancias mutagénicas usadas en la industria o presentes en el ambiente como subproductos industriales.

- A.- Agentes alquilantes industriales.
- B.- Disolventes orgánicos, compuestos organometálicos.
- C.- Contaminantes del agua.
- D.- Contaminantes del aire.
- E.- Metales pesados.

Grupo III.- Sustancias mutagénicas de origen natural.

- A.- Alcaloides.
- B.- Productos del metabolismo microbiano.

las células sexuales generándose alteraciones heredables; o bien, si los cambios genéticos ocurren en las células somáticas, pueden causar el desarrollo de cáncer (Loprieno, 1980; De Flora y Ramel, 1988).

En la figura 1 se muestran algunas de las interacciones

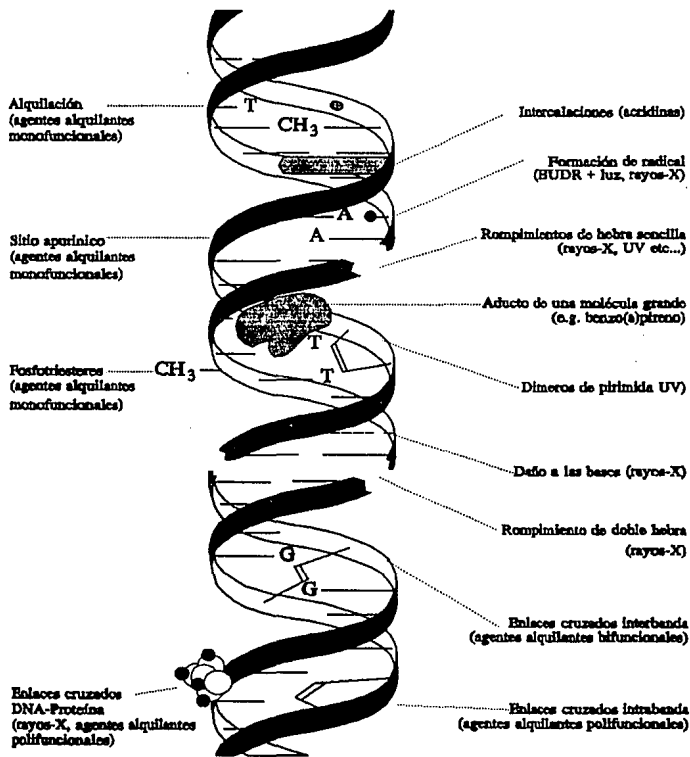


Fig. 1 Interacción del DNA con agentes físicos y químicos (Obe y Natarajan, 1982).

posibles con el DNA. Dichos procesos son modificados además, por parámetros fisicoquímicos como: lipofilicidad, actividad óptica, interacción con enzimas, factores estéricos, reactividad absoluta y relativa, mono o multifuncionalidad (Zijlstra, 1987; Waters et al., 1990).

También la dieta de los seres humanos contiene gran variedad de mutágenos y carcinógenos naturales, de los cuales algunos actúan por la generación de radicales libres que pueden funcionar como iniciadores endógenos de procesos degenerativos como daño al DNA, mutación y promoción, los cuales se relacionan con el cáncer, el envejecimiento y las enfermedades del corazón (Ames, 1983; Carr, 1985).

El hombre interacciona en forma laboral, voluntaria y/o accidental con una gran variedad de agentes físicos y químicos (Sorsa y Vainio, 1982); en la figura 2 se muestran las principales rutas de ingreso para los diferentes compuestos. La principal ruta de distribución es el sistema circulatorio, mediante el cual los compuestos son transportados para alcanzar al órgano blanco, llegar a los sistemas de excreción y eliminación, o bien, a los tejidos en los que pueden ser almacenados (Klaaseen, 1975).

Los agentes químicos dentro del organismo pueden actuar básicamente de dos formas: 1) de manera directa, si son reactivos por sí mismos y, por consiguiente, son detectados fácilmente en todos los sistemas de prueba; y 2) de manera indirecta, es decir, al no ser genotóxicos por sí mismos (promutágenos), requieren ser activados por las enzimas presentes en los organismos a derivados

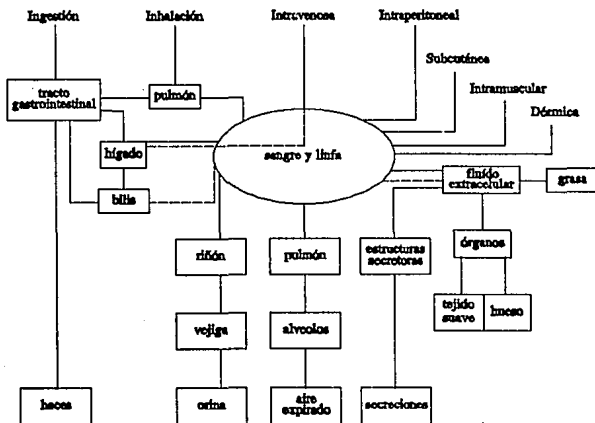


Fig. 2 Rutas de exposición y excreción de sustancias en el hombre (Klassen, 1975).

reactivos electrofílicos (Obe, 1982).

Debido a las graves implicaciones del cáncer, la investigación acerca de los agentes que puedan combatirlo se ha incrementado, de modo que en la actualidad se utilizan gran variedad de sustancias en la quimioterapia del cáncer, en la que se incluyen antimutágenos y anticarcinógenos naturales; estos agentes son: antimetabolitos, hormonas, enzimas, antibióticos, vitaminas A y E, agentes alquilantes (Novic y Szilar, 1952; Sainsburry, 1979; Stock, 1970; Pratt y Ruddon, 1979; Waters *et al.*, 1990).

La presencia de compuestos peligrosos en el ambiente conduce a desarrollar metodologías rápidas y sensibles para detectarlos,

por lo que es necesario identificar aquellas sustancias potencialmente cancerígenas y anticancerígenas, así como buscar alternativas para disminuir a las del primer tipo, ya existentes en el ambiente (Castañeda, 1988). En relación con las del segundo tipo, es necesario mencionar que existen antimutágenos y anticarcinógenos que actúan a través de mecanismos múltiples, abarcando un amplio rango de niveles de intervención (De Flora y Ramel, 1988).

Dentro de los diferentes antimutágenos y anticarcinógenos se han reportado los productos extraídos de plantas. Se ha mostrado que las fracciones de alcaloides extraídos del mirto (Vinca rosae), así como el principio activo de Maytenus diversiflora conocido como maytancina tienen propiedades antileucémicas en ratón (Pratt y Ruddon, 1979; Lee et al., 1982); los extractos de Wikstroemia indica, de la que los principales agentes son tricina kaempferol-3-O-B-D-glucopyranosido y la nortachelogenina también son antileucémicos. En ratón, la dafnoretina se ha reportado como un potente anticancerígeno in vivo (Lee et al., 1981).

En Witheringia coccoloboides se han aislado dos fracciones: la fisalina y 25,26-epidihidrofisalina que son citotóxicas en células cancerígenas de ratón in vitro; además, la phisalina B tiene actividad moderadamente antileucémica en ratones in vivo (Antoun, 1981).

La investigación de nuevos compuestos antitumorales de origen natural no se limita a plantas superiores, si bien, la mayoría de éstos tienen este origen (Evans, 1991) (Tabla IV).

Tabla IV. Algunos compuestos anticancerosos procedentes de plantas (Evans, 1991).

| Familia | Fuente | Clase | Compuesto |
|---------------|-------------------------------|------------------|----------------|
| Convolvulacea | <u>Ipomoea batatas</u> | Monoterpenos | 4-Ipomeanol |
| Compositae | <u>Liatrina chapmanii</u> | Sesquiterpenos | Liatrina |
| Euphorbiaceae | <u>Jatropha gossypifolia</u> | Diterpenos | Jatrofa |
| Crupressaceae | <u>Juniperus chinensis</u> | Lignanós | Podofilotoxina |
| Bignoniaceae | <u>Jacaranda caucana</u> | Quinonas | Jacaranona |
| | | Alcaloides | |
| Leguminoceae | <u>Crotalaria spectabilis</u> | Pirrolizidina | Monocrotalina |
| Rutaceae | <u>Acronychia baueri</u> | Acridona | Acronicina |
| Lilaceae | <u>Colchicum speciosum</u> | No heterocíclico | Colchicina |
| Rubiaceae | <u>Bouvardia ternifolia</u> | Péptidos | Buwardina |

Un estudio en las células somáticas de Drosophila melanogaster mostró que ninguno de los extractos de la raíz, el tallo y la flor de Tagetes filifolia (Compositae) resultó mutagénico en el modelo utilizado. Sin embargo, un hallazgo importante fue que los extractos de raíz y flor disminuyeron de manera significativa ($P=0.05$) la frecuencia de manchas mosaico inducida por el agente alquilante N-nitrosodimetilamina (DMN) (García *et al.*, 1992).

Otra familia de plantas de uso etnobotánico y medicinal en

México es la Convolvulaceae, familia de 35 géneros y 1650 especies. La mayoría son herbáceas, anuales o perennes, frecuentemente con tallos trepadores; pocas son arbustos y árboles. Entre sus géneros está Ipomoea, del cual se han descrito 600 especies y se encuentra de manera silvestre en casi toda la República, aunque predominan en Veracruz. Dentro de este género se ubica la especie Ipomoea orizabensis, planta herbácea de amplio uso medicinal. Se conoce vulgarmente como raíz de escamonea de México, Jalapa de Orizaba, Manto de la Virgen y Quiebra platos. La Jalapa de Orizaba es la raíz desecada de la planta voluble, fusiforme de unos 60 cm de longitud. La raíz se colecta en el estado de Veracruz en la localidad de Orizaba. La Jalapa de Orizaba se exportó en un principio como sustituto o adulterante de la Jalapa o su resina. La resina de I. orizabensis es, no obstante, más soluble en éter que la resina de Jalapa (Evans, 1991).

La superficie externa de la raíz está recubierta por un súber de color pardo grisáceo y arrugado. La superficie del corte transversal es grisácea o pardusca y muestra unos tres anillos concéntricos de haces fibrovasculares (Evans, 1991).

Los tubérculos contienen almidón, oxalato cálcico, azúcar no cristalizable, goma, materia colorante y dos resinas; la jalapina y la convolvulina, ácido jalapónico y algunas sales minerales (Cabrera, 1975).

El tejido parenquimatoso, tanto de la región cortical como de la central, recuerda al de la Jalapa, por contener almidón y oxalato cálcico. Al igual que en ésta, en los cortes se aprecian

numerosas células secretoras dispersas en un contenido resinoso. La droga contiene un olor ligero, y sabor ligeramente acre. Cuando se extrae con alcohol (90 %) da alrededor del 10 al 20 % de una mezcla resinosa compleja, de la que aproximadamente el 65 % es soluble en éter. Los principales componentes de la resina de Orizaba son metil-pentosas y otros heterósidos del ácido jalapínico y su éster metílico. También hay sitosterol y heterósidos de fitosterol (Evans, 1991).

La Jalapa de Orizaba se utiliza principalmente para la preparación de la resina de su nombre. Los indígenas utilizaban esta planta como purgante (Evans, 1991).

El principio activo es la resina, que obra como un purgante energético, provoca afluencia de líquidos en el intestino por acción irritativa, lo que aumenta la producción de bilis y estimula los movimientos peristálticos (Cabrera, 1975).

Otro producto relacionado es el 4-ipomeanol, toxina aislada del camote (*Ipomoea batatas*) infectada por hongos, que cuando se ingiere, afectan al pulmón y riñón de los mamíferos. El 4-ipomeanol es oxidado selectivamente por enzimas de ciertas células del pulmón, para dar un aldehído reactivo; así se provee de un potente agente alquilante, tan sólo en las células que contienen el sistema enzimático (Evans 1991).

Se ha mostrado que las resinas glicosídicas de ciertas especies de *Ipomoea* tienen actividad antimicrobiana y antitumoral en ratones (Bhakuni et al., 1969; Sarin et al., 1973; Bieber et al., 1986).

La investigación de la actividad genotóxica de compuestos derivados de plantas de uso medicinal y la determinación de su potencial protector y modulador, puede aportar elementos valiosos en la campo de la salud (Brusick, 1987).

La mosca de la fruta, Drosophila melanogaster, ha sido utilizada en pruebas de mutagénesis de manera rutinaria. Pueden analizarse un amplio espectro de alteraciones genéticas inducidas por agentes ambientales, tanto en células somáticas como en células germinales (Rodríguez-Arnaiz y Ramos, 1992) (Tabla V).

Desde el momento en que la larva eclosiona del huevo, hasta que emerge el imago (adulto), el ciclo de vida de Drosophila melanogaster es de aproximadamente de 192 horas a 25 ± 1 °C. La larva pasa por tres estadios y dos mudas larvales, la primera muda ocurre a las 25 horas y la segunda a las 48, la formación del pupario se da aproximadamente a las 96 horas (Demerec, 1965; Roberts, 1986; Ramos et al., 1993) (Fig. 3).

Después de un día de desarrollo embrionario, eclosiona del huevo una pequeña larva, su cuerpo se encuentra formado por doce segmentos no aparentes: 1 segmento de la cabeza, 3 torácicos y 8 abdominales. La pared de su cuerpo esta formada por una cutícula externa no celular y por una epidermis celular interna; la cutícula esta formada por dos capas: la exocutícula, y la endocutícula (Demerec, 1965).

Las células imagales que no están involucradas en la formación del cuerpo de la larva, son distinguibles de las células larvales por su tamaño pequeño, constitución diploide de los cromosomas,

Tabla V. Características de Drosophila melanogaster.

- 1.- Es el eucarionte mejor conocido genéticamente.
- 2.- Se pueden realizar estudios in vivo e in vitro.
- 3.- El ciclo de vida dura de 9 a 10 días a 25 °C y 60 % de humedad relativa, involucra un periodo de embriogénesis completo dentro del huevo, y una secuencia de estadios larvales que derivan en una metamorfosis completa de la que finalmente surge un imago o adulto (Rodríguez-Arnaiz y Ramos, 1992).
- 4.- Tiene cuatro cromosomas perfectamente mapeados
- 5.- La presencia de un paquete enzimático en la fracción microsómica muy semejante al del hígado de mamíferos, permite la biotransformación in vivo de los compuestos (Baars et al., 1980).
- 6.- Se conoce el tiempo de su gametogénesis; se tratan estados pre y postmeióticos para evaluar la respuesta en cada una de sus etapas (Chandley y Bateman, 1962).
- 7.- Se mantiene en espacios reducidos y su costo va de moderado a bajo.
- 8.- Se obtienen poblaciones numerosas: 500 organismos por pareja.
- 9.- Dimorfismo sexual positivo hacia la hembra.
- 10.- Tipo de exposición: de aguda a crónica.
- 11.- Se pueden realizar estudios en células somáticas y células germinales (Rodríguez-Arnaiz y Ramos, 1992).
- 12.- Los agentes a probar pueden administrarse por alimentación, inyección o en forma gaseosa, esto depende de las propiedades físico-químicas del compuesto y de los objetivos a realizar (Kilbey et al., 1981).
- 12.- Existe una gran cantidad de líneas con marcadores genéticos que permiten la evaluación de diversos efectos génicos y cromosómicos.

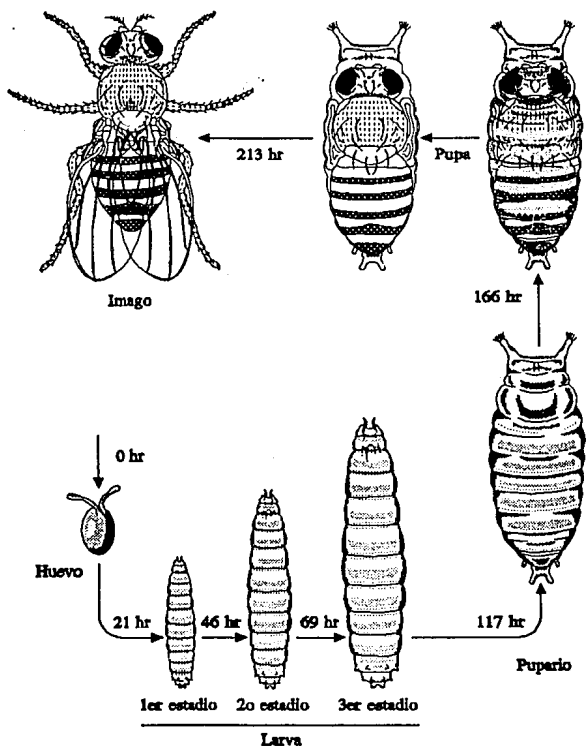


Fig. 3 Ciclo de vida de *Drosophila melanogaster*, la duración de los estadios es a 25 °C

retención de la capacidad de división celular, y porque alcanzan su diferenciación hasta que entran a la metamorfosis. Los discos imagales aumentan de tamaño por mitosis, las cuales ocurren a determinados tiempos durante el desarrollo larvario. Las células larvarias forman todo el cuerpo de la larva, estas células han perdido su capacidad de división y solamente aumentan de tamaño, en algunas se presentan cromosomas politénicos característicos (Demerec, 1965; Wilkins, 1986; Würigler y Vogel, 1986; Pomerai, 1990).

Durante la metamorfosis, la hormona ecdisona desencadena una serie de cambios en el organismo, este proceso involucra la

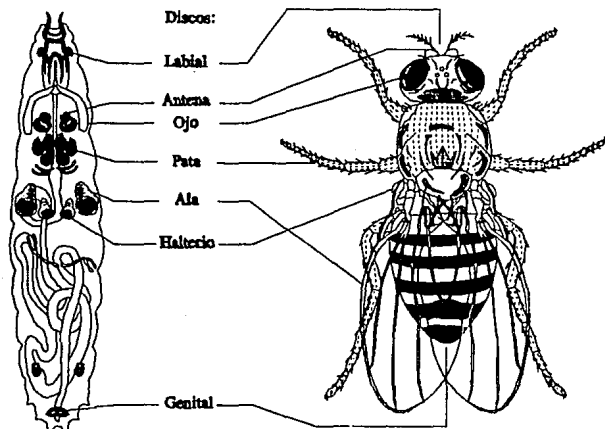


Fig. 4 Los discos imagales de *Drosophila melanogaster* originan diversas estructuras del adulto por una serie de divisiones mitóticas.

destrucción de ciertos tejidos y órganos de la larva, y la organización de las estructuras del adulto, a partir de un complejo de células primitivas, los discos imagales, a partir de los cuales se forman todos los órganos del adulto. Los tubos de malpigi se alteran poco durante la metamorfosis, aunque sí sufren algunos cambios en su composición estructural; el tórax se forma por la combinación de varios discos imagales. Las extremidades, ojos, antenas, alas y el aparato genital se diferencian a partir de su disco imagal respectivo que sufre una histogénesis durante el desarrollo pupal, dando origen a las distintas partes del cuerpo del adulto (Figuras 4 y 5).

Los análisis bioquímicos realizados tanto en larvas como en organismos adultos de Drosophila melanogaster, han revelado que poseen alta capacidad de activación-desintoxicación, gracias a la presencia de enzimas dependientes de citocromo P-450, similares a la fracción S9 del hígado de mamíferos (Baars et al., 1980; Hällström et al., 1992).

El sistema citocromo P-450 de estos organismos se encuentra distribuido en mayores concentraciones en el intestino medio, en los cuerpos grasos y en los túbulos de malpigió. A nivel subcelular, las monooxigenasas se encuentran localizadas en retículo endoplasmático liso y en las mitocondrias (Kulkarni y Hodgson y, 1980; Hodgson y Randy, 1991).

En la prueba de mutación y recombinación somáticas (SMART; son las siglas en inglés de Somatic Mutation and Recombination Test), los resultados se obtienen en una sola generación de moscas, con un

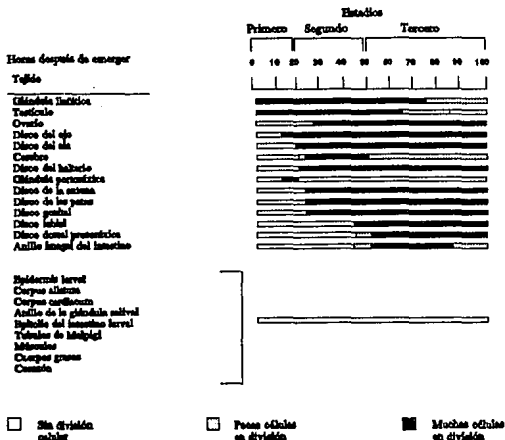


Fig. 5 Patrones de división celular para varios tejidos larvales e imagales durante el desarrollo de la larva de *Drosophila melanogaster* (Gilbert, 1990).

genotipo tal que un evento mutacional en las células de los discos imagales origina un cambio que se manifiesta fenotípicamente en todas las células hijas a partir de la célula madre mutante, constituyendo así un clon celular que se expresará en el adulto como una mancha distinguible, cuando se utilizan los marcadores apropiados (Baker et al., 1978; Graf et al., 1984; Vogel y Zijlstra, 1987).

Cuando se evalúan compuestos no alquilantes, la prueba SMAR tiene valores altos de sensibilidad (0.75 - 0.78) y especificidad (0.83 - 0.86) (Vogel, 1987; Graf y Würzler, 1988; Vogel y Szakmary, 1990). Con esta prueba se han obtenido además resultados

positivos con diversos mutágenos y una gran variedad de promutágenos (Würgler, 1986).

Además de ser un sistema relativamente rápido, el número de células implicadas por organismo es elevado: 24400 células para el protocolo que emplea las alas y 800 omatidias el que emplea los ojos (Clements, 1988; Clements et al. 1988).

Es un sistema que permite detectar la capacidad de los agentes químicos para inducir mutación y recombinación a nivel somático. Este tipo de estudios cobran día con día gran importancia debido a que existe correlación entre la actividad recombinogénica y la carcinogénesis.

La duración de la etapa disponible para aplicar la prueba (fase larvaria) permite diseñar protocolos combinados que incluyan tratamientos consecutivos o bien combinaciones de éstos: crónico-agudo, agudo-crónico y mezclas. Lo anterior resulta importante si se busca establecer la existencia de sinergismo positivo (potenciación), o de sinergismo negativo (antagonismo) entre dos o más sustancias (Casarett, 1975).

La N-Nitroso-dimetilamina (DMN) es ampliamente usada en estudios de mutagénesis, es un alquilante, promutágeno, y un carcinógeno potente (EMS, 1976). Induce tumores en diferentes partes del organismo según sea la ruta de administración, por ejemplo, concentraciones de 25 ppm y 50 ppm de DMN en la dieta de conejos ocasionan carcinomas hepatocelulares (EMS, 1976); en ratas sometidas a inhalaciones repetidas se inducen tumores en las cavidades nasales y en el riñón (EMS, 1976); cuando se administra

por vía oral a diferentes líneas de ratones provoca sarcomas, carcinomas y adenomas en pulmón (EMS, 1976); en células germinales de Drosophila melanogaster induce letales recesivos ligados al sexo y pérdida cromosómica (Vogel y Natarajan, 1979 a y b). En la prueba SMAR, tanto en los ojos, como en las alas, induce todos los tipos de mancha a concentraciones que van desde 0.5 a 50 mM (Delgado, 1990; Ordaz, 1991; García, 1992).

El descubrimiento de la actividad carcinogénica de la N-nitrosodimetilamina ha permitido establecer que los compuestos N-nitroso y otros agentes alquilantes puedan ser una clase importante de compuestos carcinogénicos (Laval et al. 1990). La DMN se ha encontrado en pequeñas cantidades en muestras de humo condensado de tabaco, en carnes curadas como el tocino, y el pescado salado y ahumado, también se utiliza como solvente y en la síntesis del combustible 1-dimetilhidrazina. La DMN se forma por la interacción del nitrito con dimetilamina, y por la acción de bacterias reductoras de nitrato. Es usado como solvente en la industria del plástico y la fibra; como antioxidante, aditivo para lubricantes y en condensadores para incrementar la constante dieléctrica, también se usa como nematocida (Index Merk, 1989). La DMN es un líquido amarillo de baja viscosidad, miscible en agua, soluble en la mayoría de los solventes orgánicos y en lípidos, es muy volátil, su fórmula química es $(CH_3)_2NNO$, esta formado por C(32 %), H(8.16 %), N(37.82 %) y O(21.60 %), su peso molecular es 74.08 g, y su densidad: 1.0048 (Index Merx, 1989). La figura 6 muestra la biotransformación de la N-nitroso-dimetilamina.

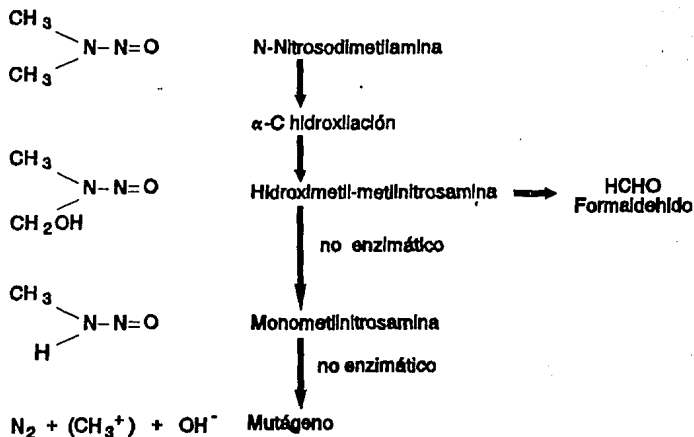


Fig. 6 Biotransformación de la N-Nitrosodimetilamina (DMN) (Margison y O'Connor, 1979).

Los objetivos del presente trabajo son:

- 1) Analizar el potencial genotóxico de la resina de la raíz de *Ipomoea orizabensis* mediante la prueba de recombinación somática en células del ala de *Drosophila melanogaster*.
- 2) Determinar si la resina de *Ipomoea orizabensis* tiene potencial protector sobre la genotoxicidad de la N-Nitroso-dimetilamina (DMN) en células somáticas de las alas de *Drosophila melanogaster*
- 3) Comparar el potencial protector de la resina administrada antes y después de mutágeno de referencia..

MATERIAL Y METODOS

Compuestos Químicos

N-Nitrosodimetilamina (DMN), Tween 80, de Sigma; Dimetil Sulfoxido (DMSO), Sacarosa, de Baker; Celulosa microcristalina de Merck.

El extracto (resina) de raíz de Ipomoea orizabensis fue proporcionado amablemente por la Dra. Cristina Pérez Amador, del Laboratorio de Química de la Facultad de Ciencias de la UNAM.

La raíz se colectó en la localidad de Aculzingo Veracruz en el año de 1991 y la resina se obtuvo mediante una destilación alcohólica.

Concentraciones

En experimentos preliminares se seleccionó la concentración del testigo positivo, DMN [925 ppm], ya que a esta concentración se inducen manchas de todos los tipos de manera significativa.

En experimentos preliminares se determinaron las concentraciones de la resina, de manera que no provocara toxicidad a la progenie. Se emplearon 2500, 3750, 4375, 5000 y 6250 ppm. Al ser insoluble en agua y alcohol, la resina de Ipomoea orizabensis se solubilizó utilizando una combinación de dimetil-sulfóxido (DMSO) y Tween 80. La resina se colocó en DMSO al 1.5 % y se agitó hasta disolverse, posteriormente se agregó Tween 80 al 1 % y se volvió a agitar; por último, y gota a gota, se agregó el agua necesaria para realizar la solución y se agitó, hasta homogeneizar. El tween le

dió estabilidad a la solución, ya que al agregar el agua en ausencia de éste, la solución adquiriría una coloración lechosa (se formaba una emulsión), lo que se evitó con el uso del tween.

Sistema de Cruzas

Se utilizaron dos líneas con marcadores fenotípicamente reconocibles: fir³ y mwh (Fig. 7).

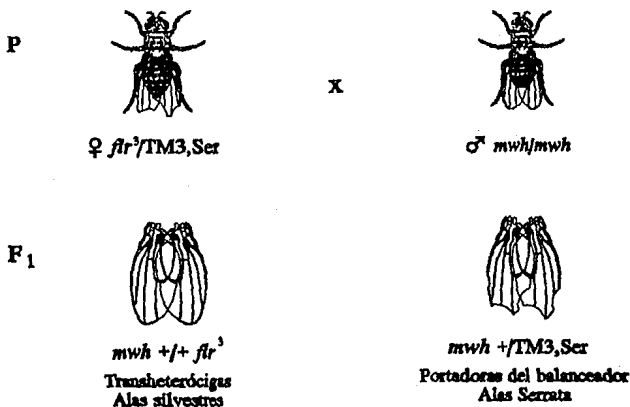


Fig. 7 Origen de las moscas transheterocigas mwh +/+ fir³.

La craza progenitora se realizó con hembras fir³/TM3, Ser de 72 ± 4 horas de edad y machos mwh/mwh de 48 ± 4 de edad (para una descripción detallada de los marcadores consultar Lindsley y Grell, 1968; García Bellido y Dapena, 1974; Lindsley y Zimm, 1990).

Las larvas trasheterocigóticas flr³/mwh conforman la mitad de la progenie, la otra mitad consiste en larvas mwh/TM3,Ser. No existen diferencias evidentes entre los dos tipos de larvas, por lo que se tratan juntas, pero después de la metamorfosis, las moscas portadoras de los marcadores + flr³/mwh + (alas silvestres), pueden distinguirse claramente de las moscas adultas mwh/TM3,Ser (alas con bordes discontinuos). Las alteraciones genéticas inducidas causan fenotipos reconocibles en las células de las alas, ya que en un contexto de tricomas silvestres, pueden observarse tricomas que expresan el fenotipo flr³, mwh o ambos (Fig. 8).

La recombinación mitótica entre flr³ y el centrómero produce

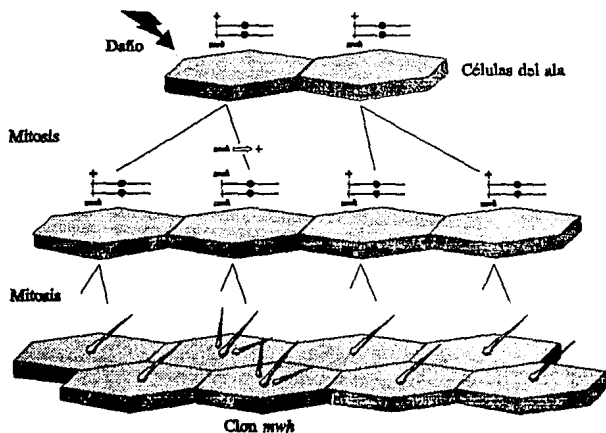


Fig. 8 Producción de un clon mwh en células alteradas, mediante división mitótica

manchas gemelas mwh-flr³, la recombinación entre los marcadores mwh y flr³ genera manchas sencillas mwh. El tipo mwh también puede originarse por otros eventos genéticos, tales como deleción, mutación puntual y no disyunción (Graf et al., 1984; Becker et al., 1976) (Fig. 9).

En general, el tamaño de un clon es más grande cuando se induce en larvas jóvenes (24 a 48 horas), y más pequeño cuando se tratan larvas de mayor edad (72 o más horas); y el número de células blanco será mayor mientras más avanzada sea la edad de la larva (García Bellido y Merriam, 1971; Szabad et al., 1983)

Procedimiento Experimental

Para la realización de este trabajo se desarrollaron dos tipos de protocolos con el fin de determinar la actividad genotóxica de la resina de la raíz de Ipomoea orizabensis, y su potencial protector, cuando se administra antes o después del control positivo (mutágeno de referencia). La figura 10 muestra un esquema de los dos protocolos.

En el primero, las larvas se expusieron a la resina durante 48 horas (tratamiento crónico), y posteriormente a la N-nitrosodimetilamina (DMN) durante 6 horas (tratamiento agudo). En el segundo, se administró primero el tratamiento agudo con la DMN durante 6 horas y, posteriormente, el tratamiento crónico con el extracto de la raíz durante 48 hr. Para evaluar si la resina es genotóxica se utilizaron los mismos protocolos pero, se sustituyó a la DMN por sacarosa al 5%.

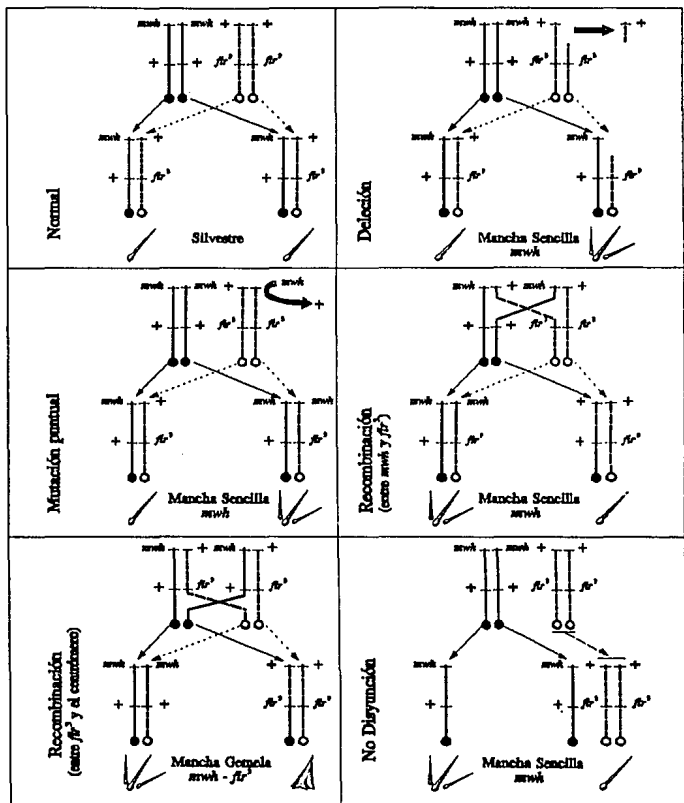
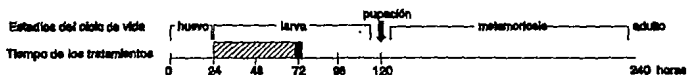
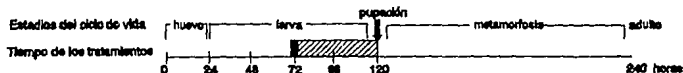


Fig. 9 Eventos genéticos y tipos de manchas detectados en la SMA
(Modificado de Graf *et al.*, 1984).

Protocolo 1. Exposición: 24 X 48 X 6 hrs.



Protocolo 2. Exposición: 72 X 6 X 48 hrs.



Tratamientos:

■ Agudo: DMN (925 ppm) ó sacarosa 5%.

▨ Crónico: /pomoxa (2500, 3750, 4350, 5000, 6250 ppm)

Fig. 10 Esquema de protocolos utilizados.

Tratamientos

Para obtener larvas de edad similar, a las 72 horas después de realizar la cruce se colectaron los huevecillos durante 8 horas sobre medio fresco. A continuación se indica el procedimiento seguido en cada uno de los protocolos.

1) A los frascos que contenían las larvas de 24 ± 4 hr de edad se les agregó 1 ml de la solución de resina, que se distribuyó sobre la superficie del medio de cultivo (tratamiento crónico), transcurridas 48 horas se extrajeron las larvas de acuerdo con el procedimiento de Nöthinger (1970), que consiste en separar las larvas del medio mediante una solución concentrada de sacarosa al

20 %, posteriormente la solución se vertió en un embudo de separación, del que se recuperaron las larvas utilizando una malla de nylon, se enjuagaron en agua corriente, se colocaron en un tubo homeopático de 10 ml de capacidad, al cual se le fijó en un extremo una gasa de nylon, y un tapón de hule espuma en el otro; posteriormente éste se introdujo en un vaso de precipitado de 10 ml conteniendo 0.06 g de celulosa en polvo y 0.5 ml de la solución a tratar (DMN o sacarosa al 5 %) por 6 horas (tratamiento agudo), después los tubos homeopáticos se retiraron del vaso, las larvas se enjuagaron en agua corriente y se colocaron en frascos con medio de cultivo fresco para que continuaran su desarrollo. Así la exposición total fue de 24 x 48 x 6.

2) Larvas de 72 ± 4 horas, se trataron en forma aguda, posteriormente se enjuagaron con agua corriente y se colocaron en frascos con medio fresco sobre el que se agregó 1 ml de la solución de resina (tratamiento crónico), y se dejó que continuaran su desarrollo como se indicó en el primer protocolo, para una exposición total de 72 x 6 x 48. Paralelamente se corrieron los testigos concurrentes. En la tabla VI se muestran los diferentes lotes utilizados. Para cada lote se realizó un experimento y dos repeticiones.

Análisis de las Alas

Los adultos transheterocigóticos se sacrificaron por exceso de anestesia (éter) y se fijaron en etanol al 70 %. Las alas se separaron con la ayuda de unas pinzas de relojero y se montaron en

Tabla VI. Diseño experimental utilizado.

Mutagénesis

1. Exposición: 24 X 48 X 6 hr

| Lote | Tratamiento crónico | Tratamiento agudo |
|-------------------|---------------------|-------------------|
| Testigo negativo* | DMSO-Tween | Sacarosa 5% |
| Experimentales | Ipomea [ppm] | |
| | 2500 | + |
| | 3750 | + |
| | 4375 | + |
| | 5000 | + |
| | 6250 | + |

2. Exposición: 72 X 6 X 48 hr

| Lote | Tratamiento agudo | Tratamiento crónico |
|-------------------|-------------------|---------------------|
| Testigo negativo* | Sacarosa 5% | DMSO-Tween |
| Experimentales | | Ipomea [ppm] |
| | + | 2500 |
| | + | 3750 |
| | + | 4375 |
| | + | 5000 |
| | + | 6250 |

Antimutagénesis

1. Exposición: 24 X 48 X 6 hr

| Lote | Tratamiento crónico | Tratamiento agudo |
|--------------------|---------------------|-------------------|
| Testigo positivo** | DMSO-Tween | DMN [925 ppm] |
| Ipomea [ppm] + DMN | 2500 | + |
| | 3750 | + |
| | 4375 | + |
| | 5000 | + |
| | 6250 | + |

2. Exposición: 72 X 6 X 48 hr

| Lote | Tratamiento agudo | Tratamiento crónico |
|--------------------|-------------------|---------------------|
| Testigo positivo** | DMN [925 ppm] | DMSO-Tween |
| DMN + Ipomea [ppm] | + | 2500 |
| | + | 3750 |
| | + | 4375 |
| | + | 5000 |
| | + | 6250 |

*, DMSO [1.5 %] + Tween 80 [1 %]; **, DMN [925 ppm] + DMSO [1.5 %] + Tween 80[1 %]

porta objetos utilizando solución fauré (Graf et al., 1984). En cada laminilla se montaron 40 alas, 20 de hembras y 20 de machos; se analizaron en un microscopio óptico, a un aumento de 40X. Cada mancha se registró de acuerdo a la sección del ala en la que se encontró (García Bellido y Merriam, 1971; Graf et al., 1984); el número de células que la formaba; y, el fenotipo de ésta: mwh, fir o ambos (Fig. 11).

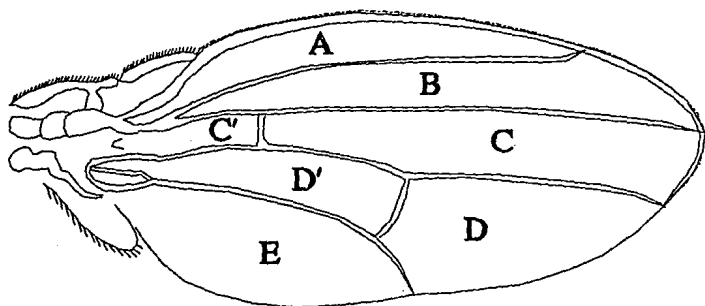


Fig 11 Sectores del ala de *Drosophila melanogaster* utilizados en la SMART.

Análisis Estadístico

Los datos se procesaron con la ayuda del programa de computo SMART (Würgler 1988 no publicado), y el procedimiento de decisión múltiple de Frei y Würgler (1988), con un nivel de significancia

del 5 %. La decisión se basa en el contraste de dos hipótesis.

La hipótesis nula (H₀), señala, que no hay diferencias entre la frecuencia de mutación en las series testigo y las tratadas. Si, en estas últimas, la frecuencia de mutación se incrementa de manera significativa, la H₀ se rechaza. Por otro lado, la hipótesis alternativa (H_a), postula, que en las series tratadas hay un incremento estadístico igual a "m" veces la frecuencia basal. Dado que la frecuencia de manchas sencillas de menos de tres células y de manchas totales, es mucho mayor que la frecuencia de manchas simples de más de tres células y la de manchas gemelas, se utiliza $m = 2$ para las primeras y $m = 5$ para las últimas.

Si se acepta la H₀ y se rechaza la H_a el resultado es negativo (-), por el contrario, si se rechaza la H₀ y se acepta la H_a, el resultado es positivo (+); por otro lado, si las dos hipótesis se rechazan, el resultado se considera débil positivo (d+), y si ambas se aceptan, el resultado es indeterminado (i) (Tabla VII).

En algunas ocasiones surgen células con dos tricomas, esto puede deberse a alteraciones en la diferenciación celular que no corresponden a expresiones típicas de mwh por lo que, para evitar errores en la clasificación de las manchas, se consideran como expresiones mwh sólo aquellas que se encuentran dentro o en la periferia de una mancha mwh (con más de tres pelos) (Graf et al., 1984). Los clones grandes generalmente tienen una forma elongada en la dirección del eje longitudinal del ala y puede presentar forma de Z. Aunque la mayoría de los clones son continuos, algunos se pueden presentar interrumpidos, debido a la separación parcial de

Tabla VII. Diagnóstico estadístico del procedimiento de decisión múltiple de Frei y Würzler (1988).

| HIPOTESIS | Se acepta H _A | Se rechaza H _A |
|------------------------------|-----------------------------|------------------------------|
| Se acepta H ₀ | Indeterminado | Negativo |
| Se rechaza H ₀ | Positivo | Débil Positivo |

Cruza: ♀♀ fr³ / TMS, Ser X ♂♂ mwh/mwh

Edad de las larvas y duración: Protocolo 1: 24 x 48 x 6
2: 72 x 6 x 48

Compuesto a probar: Resina de *I. orizabensis* [2500, 3750, 4375, 5000 y 6250 ppm]
Disolventes: DMSO [1.5 %] + Tween 80 [1.0 %]

Control positivo: N-nitroso-dimetilamina, DMN [925 ppm]
Disolvente: sacarosa [5 %]

Tamaño de muestra: 120 alas

Repeticiones: 3

Registro de datos: las alas se revisaron a 40X y se contabilizó el número, tamaño y tipo de mancha

Análisis estadístico: según Frei y Würzler, 1988

Fig. 12 Resumen de la metodología.

las células del clon durante el desarrollo por presiones tisulares o movimientos celulares independientes (García Bellido y Merriam, 1971). Para la valoración de este tipo de clones y de acuerdo con los criterios utilizados por Graf et al. (1984) se contaron como clones independientes aquellos que se encontraban separados por tres o más hileras de tricomas normales.

En la figura 12 se muestran un resumen de la metodología.

RESULTADOS

Los resultados obtenidos en cada repetición fueron comparados, al no encontrar diferencias significativas ($P > 0.05$) entre ellos, se procedió a sumarlos con el fin de obtener el tamaño de muestra propuesto.

Los resultados obtenidos al comparar las diferentes concentraciones de la resina con el testigo negativo de sacarosa al 5 % se presentan en las tabla VIII y IX, y en las figuras 13 y 14. En los dos protocolos de exposición: 24 X 48 X 6 hr y 72 X 6 X 48 hr, las frecuencias de todos los tipos de manchas, obtenidas al exponer las larvas a diferentes concentraciones de la resina de *Ipomoea orizabensis* no difieren significativamente de las del lote testigo. En la segunda parte del estudio, que consistió en evaluar la capacidad antimutagénica de la resina, se hicieron determinaciones en larvas de dos diferentes edades. Al exponer las larvas primero a la resina y después a la DMN (exposición 24 X 48 X 6 hr), la frecuencia de manchas en todas las concentraciones probadas fue menor, que la inducida por la DMN sola (Tabla X y Fig. 15), solamen-

te a 2500 y 3750 ppm el resultado fue débil positivo para manchas simples grandes, y gemelas; el número promedio de divisiones celulares fue similar en todos los lotes. La frecuencia por 10^5 es mayor en el testigo positivo y se reduce conforme se incrementa la concentración de la resina.

En la tabla XI se muestran los resultados obtenidos en el protocolo 2 (exposición 72 x 6 X 48 hr), puede observarse que la frecuencia de manchas simples chicas y manchas totales disminuye de manera significativa conforme se incrementa la concentración de la resina. Para manchas simples grandes (2500 y 3500 ppm), la diferencia en relación con la DMN, es débil positiva; concentraciones mayores producen frecuencias menores ($P < 0.05$). Para las manchas gemelas, la frecuencia obtenida en el lote con la DMN y 2500 ppm de la resina es similar a la obtenida sólo con la DMN; en el lote con 4375 ppm, la respuesta fue débil positiva; en todos los demás lotes con la DMN y la resina las frecuencias son significativamente menores que la frecuencia del testigo positivo (Figura 16).

Tabla VIII. Frecuencia de manchas inducidas con diferentes concentraciones de la resina de Iponcea orizabensis en células del ala de Drosophila melanogaster. Exposición 24 X 48 X 6.

| Compuesto | Núm. de alas | Manchas | | | | Div. celulas Prom. | Frec. 10 ⁻³ |
|-------------------|--------------|-----------------------|------------------------|----------------|----------------|--------------------|------------------------|
| | | Simples chicas m=2 | Simples Grandes m=5 | Gemelas m=5 | Totales m=2 | | |
| Testigo Negativo* | 120 | 12 (0.10) | 5 (0.04) | 1 (0.01) | 18 (0.15) | 2.33 | 0.6 |
| []+Sac** | | | | | | | |
| 2500 | 106 | 6 (0.06) | 8 (0.08) | 1 (0.01) | 15 (0.14) | 3.57 | 0.5 |
| 3750 | 120 | 15 (0.12) | 3 (0.03) | 2 (0.02) | 20 (0.17) | 2.50 | 0.7 |
| 4375 | 88 | 10 (0.11) | 4 (0.05) | 0 (0.0) | 14 (0.16) | 2.36 | 0.7 |
| 5000 | 108 | 15 (0.14) | 1 (0.01) | 0 (0.0) | 16 (0.15) | 1.25 | 0.6 |
| 6250 | 56 | 8 (0.11) | 1 (0.02) | 1 (0.02) | 10 (0.14) | 2.57 | 0.5 |

Análisis estadístico con el programa SMART (Würgler, no publicado), P = 0.05.

*, DMSO [1.5 %] + Tween 80 [1 %].

**, Tratamiento crónico: resina [ppm] y tratamiento agudo con sacarosa al 5%.

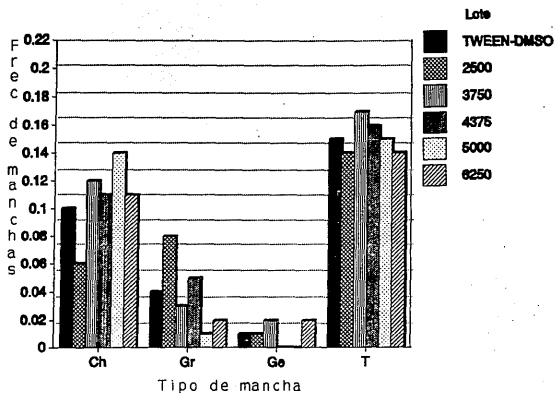


Fig. 13 Frecuencia de manchas inducidas con diferentes concentraciones de la resina de *Ipomoea orizabensis*. Exposición: 24 X 48 X 6.

Tabla IX. Frecuencia de manchas inducidas con diferentes concentraciones de la resina de Ipomoea orizabensis en células del día de Drosophila melanogaster. Exposición 72 X 6 X 48.

| Compuesto | Núm. de alas | Manchas | | | | Div. célula res Prom. | Frec. 10 ⁻³ |
|-------------------|--------------|-----------------------|------------------------|----------------|----------------|-----------------------|------------------------|
| | | Simples chicas m=2 | Simples Grandes m=5 | Gemelas m=5 | Totales m=2 | | |
| Testigo negativo* | 119 | 16 (0.13) | 4 (0.03) | 0 (0.0) | 20 (0.17) | 1.68 | 0.7 |
| Sac+ []** | | | | | | | |
| 2500 | 120 | 19 (0.16) | 1 (0.01) | 1 (0.01) | 21 (0.17) | 1.43 | 0.7 |
| 3750 | 120 | 20 (0.17) | 6 (0.06) | 0 (0.0) | 26 (0.22) | 2.27 | 0.9 |
| 4375 | 120 | 22 (0.18) | 4 (0.03) | 2 (0.02) | 28 (0.23) | 2.04 | 1.0 |
| 5000 | 120 | 15 (0.12) | 6 (0.05) | 2 (0.02) | 23 (0.19) | 2.32 | 0.8 |
| 6250 | 120 | 19 (0.16) | 4 (0.03) | 1 (0.01) | 24 (0.20) | 1.83 | 0.8 |

Análisis estadístico con el programa SMART (Würgler, no publicado), P = 0.05.

*, DMSO [1.5 %] + Tween 80 [1 %].

**, Tratamiento agudo con sacarosa al 5 % y tratamiento crónico con la resina [ppm].

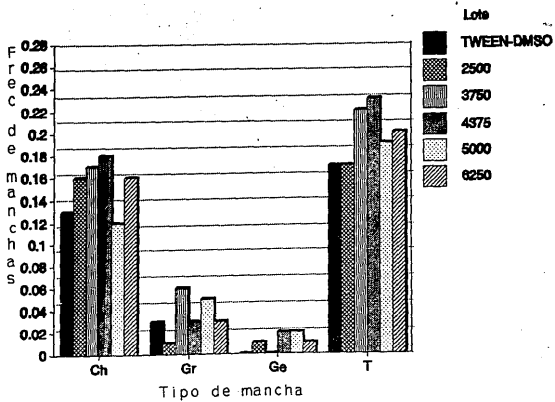


Fig. 14 Frecuencia de manchas inducidas con diferentes concentraciones de la resina de *Ipomoea orizabensis*. Exposición: 72 X 6 X 48.

Tabla X. Frecuencia de manchas inducidas por DMSO + Tween + DMN y diferentes concentraciones de la resina de *Iponoea orizabensis* en células del ala de *Drosophila melanogaster*. Exposición 24' X 48 X 6.

| Compuesto | Núm. de alas | Manchas | | | | Div. celulares Prom. | Frec. 10 ⁻⁵ |
|--------------------|--------------|-----------------------|------------------------|----------------|----------------|----------------------|------------------------|
| | | Simples chicas m=2 | Simples Grandes m=5 | Gemelas m=5 | Totales m=2 | | |
| Testigo positivo** | 116 | 129 (1.11) | 355 (3.06) | 76 (0.66) | 560 (4.83) | 3.51 | 15.5 |
| []+DMN | | | | | | | |
| 2500 | 120 | 57 (0.47)+ | 262 (2.18)d+ | 34 (0.28)d+ | 353 (2.94)+ | 4.03 | 10.1 |
| 3750 | 120 | 51 (0.43)+ | 145 (1.21)d+ | 27 (0.22)d+ | 223 (1.86)+ | 3.90 | 6.7 |
| 4375 | 120 | 42 (0.35)+ | 75 (0.62)+ | 15 (0.12)+ | 132 (1.10)+ | 3.76 | 4.1 |
| 5000 | 120 | 37 (0.31)+ | 61 (0.51)+ | 9 (0.08)+ | 107 (0.89)+ | 3.58 | 3.3 |
| 6250 | 104 | 16 (0.15)+ | 16 (0.15)+ | 4 (0.04)+ | 36 (0.35)+ | 3.56 | 1.3 |

Análisis estadístico con el programa SMART (Würgler, no publicado): +, positivo; d+, débil positivo; P = 0.05.

**, DMSO [1.5 %] + Tween 80 [1 %] + DMN [925 ppm].

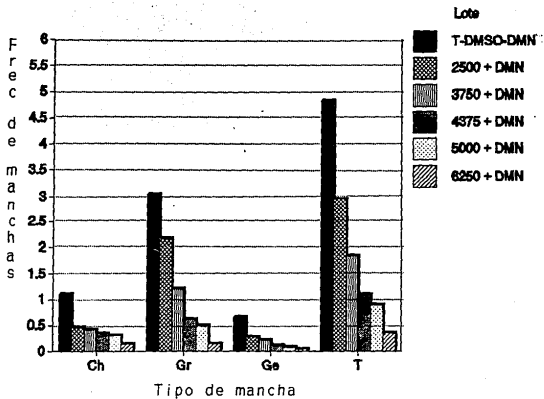


Fig. 15 Frecuencia de manchas inducidas por DMSO + Tween + DMN y diferentes concentraciones de la resina de *Ipomoea orizabensis*. Exposición 24 X 6 X 48.

Tabla XI. Frecuencia de manchas inducidas por DMN + DMSO + Tween y diferentes concentraciones de la resina de *Ipomoea oritabensis* en células del ala de *Drosophila melanogaster*. Exposición 72 X^h X 48.

| Compuesto | Núm. de alas | Manchas | | | | Div. células Prom. | Frec. 10 ³ |
|--------------------|--------------|-----------------------|------------------------|----------------|----------------|--------------------|-----------------------|
| | | Simplex chicas m=2 | Simplex Grandes m=5 | Gemelas m=5 | Totales m=2 | | |
| Testigo positivo** | 120 | 309 (2.58) | 345 (2.87) | 52 (0.43) | 706 (5.88) | 2.87 | 21.0 |
| DMN+[] | | | | | | | |
| 2500 | 113 | 89 (0.79)+ | 166 (1.47)d+ | 42 (0.37)- | 297 (2.63)+ | 3.42 | 9.3 |
| 3750 | 116 | 108 (0.93)+ | 95 (0.82)d+ | 7 (0.06)+ | 210 (1.81)+ | 2.89 | 6.8 |
| 4375 | 120 | 77 (0.64)+ | 86 (0.72)+ | 20 (0.17)d+ | 183 (1.52)+ | 3.36 | 5.8 |
| 5000 | 120 | 49 (0.41)+ | 82 (0.68)+ | 12 (0.10)+ | 143 (1.19)+ | 3.65 | 4.3 |
| 6250 | 120 | 19 (0.16)+ | 86 (0.72)+ | 15 (0.12)+ | 120 (1.00)+ | 4.72 | 3.4 |

Análisis estadístico con el programa SMART (Würgler, no publicado): +, positivo; -, negativo; d+, débil positivo; P = 0.05.

** , DMN [925 ppm] + DMSO [1.5 %] + Tween [1 %].

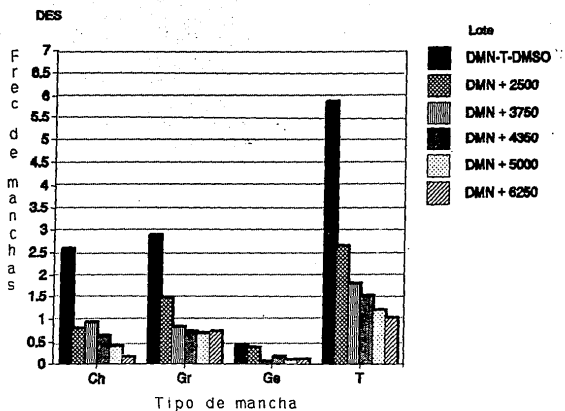


Fig. 16 Frecuencia de manchas inducidas por DMN + DMSO + Tween y diferentes concentraciones de la resina *Ipomoea orizabensis*. Exposición 72 X 6 X 48.

DISCUSION

Alrededor del 80 % de la población mundial recurre a la medicina de origen vegetal para atender sus problemas de salud, práctica que continúa debido principalmente a que no es posible brindar atención médica formal (alopática) a todos los habitantes, por razones geográficas y económicas, sobre todo en los países del tercer mundo. Sin embargo, es importante hacer notar que, en numerosas ocasiones, esta práctica se realiza sin control adecuado de la dosis necesaria, de acuerdo a las variables individuales de cada paciente.

El proceso de inducción de mutaciones por agentes químicos involucra una serie de eventos entre los cuales se encuentra la biotransformación mediada por enzimas metabólicas, en algunos casos se generan productos electrofílicos que interactúan con el DNA. Las lesiones premutagénicas o aductos, producto de esta interacción son, con frecuencia, reparadas mediante la participación de enzimas, ya sea por mecanismos libres de errores, en cuyo caso la alteración no se manifiesta, o sujeta a errores, mecanismo que promueve y fija mutaciones (Ramel, 1986; Waters et al., 1990).

En las células somáticas, el daño a los ácidos nucleicos puede ser producto de la acción de mutágenos endógenos, cuyos efectos tienden a acumularse en función del tiempo, y contribuyen de manera importante al envejecimiento celular y a diversas enfermedades degenerativas, algunas de ellas asociadas con el cáncer (Orozco, 1993). Algunos procesos endógenos son: oxidación (Hartman, 1981;

Ames, 1983), metilación, desaminación y despurinización (Saul y Ames, 1986). Las reacciones inflamatorias y la fagocitosis, inducidas después de infecciones virales o bacterianas son fuentes endógenas adicionales en la producción de radicales (Ramel, 1986).

El género Ipomoea reúne diversas especies que han destacado por ser efectivas en el tratamiento de síntomas específicos, como es el caso de I. orizabensis que junto con otras especies cercanas contiene sustancias que actúan como purgantes enérgicos, y cuyo uso en México se encuentra ampliamente difundido; por esta razón, en esta tesis se determinó si la resina de Ipomoea orizabensis tiene potencial genotóxico a diferentes concentraciones.

La determinación de la actividad genotóxica de un compuesto está dada por la comparación entre la frecuencia de manchas en las series tratadas y la del lote testigo. Esta frecuencia está en relación con el número de células expuestas al mutágeno y que dieron origen a un clon. Para estimar la cantidad de células presentes al momento del tratamiento se debe considerar la edad de la larva y el número final de células en el órgano adulto (García Bellido y Merriam, 1971; Szabad et al., 1983; Würgler, 1986; Graf y Würgler, 1988).

Se seleccionaron dos períodos de la fase larvaria para realizar la evaluación de genotoxicidad: 24 y 72 hrs de edad. En el primero las larvas se encuentran al principio del desarrollo y, en consecuencia, el número de células blanco es menor que el presente cuando la larva tiene 72 hrs; sin embargo, el número de divisiones celulares que transcurrieron hasta la metamorfosis es mayor en las

primeras que en las segundas.

La resina de Ipomoea orizabensis no resultó genotóxica al comparar las series tratadas con las diferentes concentraciones, con el testigo negativo (sacarosa al 5%). Aunque las variaciones recobradas no fueron significativas ($P > 0.05$), es importante observar que la frecuencia de manchas totales tiende a ser ligeramente menor en las concentraciones superiores (Tablas VIII y IX, y Figs. 13 y 14).

Cuando la exposición se hizo a las 24 horas, la frecuencia de manchas a 2500 ppm (0.06) fue algo menor que la control (0.10), sin embargo, esta respuesta no se repite con los otros tipos de manchas con esta concentración, pero sí a 3750 ppm para manchas grandes. En larvas de 72 horas, se observa una situación similar en la frecuencia de manchas grandes a 2500 ppm. Por lo demás, la frecuencia de manchas totales en las concentraciones tiende a ser igual o mayor que la del lote testigo. Las frecuencias menores pueden tener dos posibles explicaciones: 1) son debidas a un efecto protector de la resina (que probablemente actúa atrapando radicales libres) y 2) son producidas por las altas concentraciones utilizadas que pueden ser tóxicas para la larva y, de esta manera, los resultados estarían subestimando el efecto producido. El número promedio de divisiones celulares que estima el tamaño promedio de las manchas detectadas, fue ligeramente mayor cuando se tratan larvas tempranas, lo cual concuerda con el modelo utilizado. Al comparar el tamaño promedio de mancha de los testigos negativos a las 24 y 72 horas, con los de sus series experimentales correspon-

dientes, se observó que no existió variación significativa entre los valores recobrados, lo que permite sugerir que no se indujo toxicidad a las larvas al incrementar las concentraciones usadas.

En síntesis, en los dos tipos de protocolos, donde se caracterizó el potencial genotóxico la resina de Ipomoea orizabensis, no se encontraron evidencias de acción mutagénica alguna, además de que la edad de las larvas no modificó la respuesta obtenida.

El término antimutágeno fue utilizado originalmente para describir a aquellos agentes que reducen la frecuencia o la tasa de mutaciones espontáneas o inducidas, independientemente de los mecanismos involucrados. En ocasiones, la determinación de un mecanismo protector resulta complicada ya que el efecto antimutagénico puede producirse a distintos niveles (Ramel, 1986; De Flora y Ramel, 1988).

Al igual que en el caso de la inducción de alteraciones hereditarias, la actividad antimutagénica puede estar relacionada con diversas condiciones experimentales tales como: el tiempo de exposición y la dosis; así como las interacciones entre los agentes químicos implicados (Orozco, 1993). De esta manera, las pruebas a corto plazo que han mostrado ser efectivas para la detección de mutágenos deben, en principio, poder identificar antimutágenos (Clark y Shanckel, 1975; Jacobs et al., 1977; Kada e Inoue, 1978).

La N-Nitrosodimetilamina (DMN) es un promutágeno monofuncional que al reaccionar con oxígenos y nitrógenos de las bases que

conforman a los ácidos nucleicos (excepto el nitrógeno del enlace glicosídico), produce aductos en aproximadamente 20 sitios diferentes (Vogel, 1992); además produce rompimientos en las hebras del ADN, lo que se traduce -a nivel celular-, en actividad recombinogénica dependiente de la concentración; el tiempo de exposición al mutágeno es también un factor importante en el número de células afectadas. En la prueba de mutación y recombinación somáticas la DMN ha probado inducir todo tipo de manchas (Delgado, 1990; Ordaz, 1991); la concentración elegida (925 ppm) para el tratamiento agudo incrementa de manera significativa la frecuencia de manchas sencillas y gemelas, sin resultar excesivo el número de manchas producido.

En la determinación del potencial protector de la resina de Ipomoea orizabensis, se usaron dos tipos de protocolo: en el primero (24 X 48 X 6), las larvas recibieron primero un tratamiento crónico con la resina y después un tratamiento agudo a base de la DMN; en el segundo protocolo (72 X 6 X 48), primero se aplicó el tratamiento agudo con DMN y a continuación las larvas fueron tratadas con la resina.

Para evaluar si la resina protege a las células o no, se comparó la frecuencia de manchas inducida por la DMN en larvas que no recibieron la resina (testigo positivo), con la inducida por la DMN en presencia de la resina.

Los resultados obtenidos en el primer protocolo mostraron que la resina tiene actividad protectora dosis dependiente ($P < 0.05$) (Tabla X y Fig. 15). Este efecto protector se manifestó de manera

similar en todos los tipos de mancha. En el segundo protocolo (cuando las larvas se trataron primero con la DMN y después con la resina) (Tabla XI y Fig. 16), de nuevo fue evidente que la resina tiene actividad protectora. Con excepción de la frecuencia de manchas gemelas a 2500 ppm, que fue igual a la del testigo positivo, en todos los demás casos, las frecuencias obtenidas en las series experimentales son significativamente menores que la del testigo positivo ($P < 0.05$).

En cada tipo de exposición, el tamaño promedio de clon fue similar al de su testigo positivo correspondiente, lo cual excluyó nuevamente la presencia de un efecto citotóxico, así como la posibilidad de retraso en el desarrollo de la larva. Finalmente, en ambos protocolos, la frecuencia de manchas por 10^5 células fue progresivamente menor conforme se incrementó la concentración, lo cual coincidió con las observaciones realizadas.

En resumen, la resina de Ipomoea orizabensis muestra un efecto protector en contra de la mutagenicidad de la N-Nitrosodimetilamina (DMN), y la edad de las larvas no es determinante en la respuesta obtenida.

Los mecanismos de inhibición de la mutagénesis y de la carcinogénesis son variados y dependen de la etapa en que intervienen en cada proceso, de los patrones de modulación y de las estrategias de defensa del huésped, entre otros (Ramel, 1986).

Los compuestos que actúan extracelularmente son llamados desmutágenos y su actividad se puede ubicar en diferentes niveles: 1) al inhibir la entrada de los mutágenos o de sus precursores; 2)

al interferir la formación endógena de mutágenos; 3) al desactivar mutágenos (Kada et al., 1982). Y aquellos que pueden actuar intracelularmente (Ramel, 1986), o antimutágenos (Kada et al., 1982), los cuales: 1) modulan el metabolismo; 2) bloquean moléculas reactivas; 3) modulan la replicación del DNA o la reparación.

La información disponible hasta el momento, si bien es clara indicadora del potencial protector de la resina, no permite determinar si actúa como anti- o desmutágeno, debido a varias razones. En primer lugar, se trata de una mezcla compleja de varias compuestos, por lo que no es posible aún adjudicarle a alguno de ellos, o a la interacción de varios, el potencial protector observado; en segundo lugar, el diseño genético de la prueba de mutación y recombinación somáticas no permite discernir el momento y el mecanismo de acción de la resina.

No obstante lo anterior, la respuesta positiva obtenida en los dos protocolos utilizados permite sugerir que la resina es un desmutágeno, ya que protege tanto cuando se administra previo al mutágeno de referencia, como después; en apariencia, la resina bloquea extracelularmente a la molécula de la DMN, ya sea impidiendo su entrada a la célula, o reaccionando con ésta, lo que no permitiría la formación de aductos.

La prueba de mutación y recombinación somática en este estudio mostró que además de ser económica, sensible y específica, es una de las más versátiles, ya que posibilita además estudiar sustancias o combinaciones de éstas para determinar la acción antimutagénica de las mismas. Además, ya que ha sido probado que SMART detecta

carcinógenos -a través de la asociación entre carcinogénesis y actividad recombinogénica-, éste puede ser un tamiz preliminar para identificar posibles anticarcinógenos, a un costo relativamente bajo y en un tiempo reducido.

Estos resultados permiten considerar que los objetivos iniciales del trabajo fueron cubiertos, pero a su vez surgieron otras preguntas que pudieran ser tema de otra investigación:

Los componentes de la raíz de Ipomoea orizabensis, forman un extracto crudo, que tiene actividad protectora contra la mutagenicidad de N-Nitrosodimetilamina; para determinar si lo que protege es un solo compuesto, varios, o alguna combinación específica, éstos deben ser aislados y probados de manera independiente, y también en combinación.

Por otra parte, para caracterizar más específicamente a la resina de Ipomoea orizabensis, debe de probarse contra mutágenos con diferentes modos de acción: de acción directa y promutágenos, con distinta vida media, y aún contra carcinógenos y procarcinógenos, para determinar su rango de protección.

La inhibición de la genotoxicidad de la DMN se mostró en estos dos protocolos empleando solamente una concentración del mutágeno (925 ppm), sería necesario variar la concentración de la DMN para definir el rango de inhibición del daño inducido, por parte de la resina.

CONCLUSIONES

1. La resina de la raíz de Ipomoea orizabensis no fue genotóxica en las larvas de primer y tercer estadio.
2. La resina de Ipomoea orizabensis protege a Drosophila melanogaster de la genotoxicidad inducida por la N-Nitrosodimetilamina.
3. La protección observada fue dosis dependientes.
4. Los constituyentes de la resina actúan como posibles desmutágenos.
5. La prueba mutación y recombinación somáticas de Drosophila melanogaster es útil para detectar compuestos con actividad genotóxica y/o protectora, así como analizar interacciones entre varias sustancias de interés.

REFERENCIAS

- Albert, L.A. (1988) Curso básico de toxicología ambiental. Limusa. México. 331 pp.
- Alvarez, A.H. (1986) Diccionario de herbolaria. Posada. México. 314 pp.
- Ames, B.N. (1983) Dietary carcinogens and anticarcinogens. Science 249:970-971.
- Autoun, M.D; D. Abramson; R.L.Tyson; C. Chang; J.L. McLaughlin; G Peck y J.M. Cassady (1981) Potential antitumor agents. XVII. Physalin B and 25, 26-Epidihydrophysalin C from Witheringia coccoloboides. Journal of Natural Products. 5:579-585.
- Baars, A.J; W.G.H. Blijleven; G.R. Monh; A.T. Natarajan y D.D. Breimer (1980) Preliminar studies on the ability of Drosophila microsomal preparations to activate mutagens and carcinogens. Mutat Res. 72:257-264.
- Baker, B.S; A.T.C. Carpenter y P. Ropoll (1978) The utilization during mitotic cell division of loci controlling meiotic and disjunction in Drosophila melanogaster. Genetics. 90:531-578.
- Becker, H.J. (1976) Mitotic recombination. En: The genetic and biology of Drosophila. (M. Ashburner y E. Novitski, Eds.). Academic Press. Nueva York. Vol. 10, pp 1019-1087.
- Bieber, D.S; A.D.S. Alves; L.R.M.O. Correa; A.C. De Andrade; D.N.S. Carneiro; I.A. De Souza; J.F. De Mello y H.J. Veith (1986) Anticancer and antimicrobial glycosides from Ipomoea bahiensis. Phytochemistry. 25:1077-1081.

- Bhakuni, D.S; M.L. Dhar; M.M. Dhar; B.N. Dhawan y B.N. Mehrotra (1969) Screening of Indian plants for biological activity II. Indian J. Exp. Biol. 7:250.
- Brusick, E.W. (1987) Principles of genetic Toxicology. 2a. ed. Plenum Press Nueva York 204 pp.
- Cabrera, G.L. (1975) Yerbario mexicano. Gómez Gómez Hnos. Eds. México 239 pp.
- Carr, B.J. (1985) Chemical carcinogens and inhibitors of carcinogenesis in the human diet. Cancer 55: 218-224.
- Casarett, L.J. (1975) Origin and scope of Toxicology. En: L. J. Casarett y Doull Eds. Toxicology, the basis science of poison. Nueva York. MacMillan Pub. 3-17 pp.
- Castañeda, S.A.N. (1988) Estudio del efecto de la nemorona y la desmetil- fruticulina sobre la pérdida parcial y total de cromosomas (SCLT) en Drosophila melanogaster. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias U.N.A.M. pp 14.
- Chandley, A.C. y A.J. Bateman (1962) Timing of spermatogenesis in Drosophila using tritiated thymidine. Nature 20:229-300.
- Clark, C.H. y D.M. Shanckel (1975) Antimutagenesis in microbial systems. Bacteriol. Rev. Rev. 39:33-53.
- Del Amo, R.S. (1979) Plantas medicinales del estado de Veracruz. Instituto Nacional de Investigaciones sobre Recursos Bióticos Veracruz. México. 279 pp.
- De Flora, S. y C. Ramel (1988) Mechanism of inhibitors of mutagenesis and carcinogenesis. Clasificación and overview. Mutat. Res. 202:285-306.

- Delgado, R.A. (1990) Daño inducido por mutágenos positivos en células del ala de Drosophila melanogaster. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias. UNAM. 75 pp.
- Demerec, M. (1965) Biology of Drosophila. Hafner Publishing Co. Nueva York. 633 pp.
- De Serres, F.J. (1979) Evaluation of test for mutagenicity as indicator of environmental mutagens and carcinogens. Ann. N.Y. Acad. Sci.84:75-84.
- Environmental Mutagen Society (1976) Environmental mutagen hazar. Science 186:503-514.
- Evans; Ch.W. (1991) Farmacognosia. Interamericana McGraw-Hill. México. 901 pp.
- Fishbein; L. (1981) Sources, transpyort and alterations of metal compound an overview I: Arsenic, beryllium Cadmium and Nickel. Environ. Healt Prespec. 140:43-64.
- Frei, H. y F.E. Würgler (1988) Statistical methods to decide whether mutagen test data from Drosophila assays indicate a positive, negative or inconclusive result. Mutat. Res. 203: 297-308.
- García, G.C; L.J. Maldonado; V.R. Márquez; O.A. González; C.E. González; C.J. Rangel; P.F. Rosas; G.C. Saldaña; I.L. Moreno; M.P. Reyes; M.S. García; M.A. Muñoz; B.A. Nieto; R. N. Miranda; R.M. López; P.R. Gutiérrez; T.G. Ordaz y M.P. Morales (1991) Determinación de la capacidad antimutagénica de extractos de Tagetes filifolia en células del ala de Drosophila melanogaster. Curso de Biología de Campo. Facultad de Ciencias U.N.A.M.

- García-Bellido, A. y J.R. Merriam (1971) Parameters of the wing imagal disc development of Drosophila melanogaster. Dev. Bio. 24:61-87.
- García-Bellido, A. y J. Dapena (1974) Induction, deletion and characterization of cell diferentation mutant in Drosophila. Molec. Genet. 128:117-130.
- Graf, U; E. Würgler; A.J. Katz; H. Frei; H. Juon; C.B. Hall y P.G. Kale (1984) Somatic mutation and recombination test in Drosophila melanogaster. Environ. Mutagen. 6:153-188.
- Graf, U. y F.E. Würgler (1988) The sex-linked recessive lethal assay and recombination test in Drosophila melanogaster. En: Evaluation of short term tests for carcinogens(J. Ashby et al. Eds). Cambridge UK-WHO/Cambridge University Press. Vol. 2. pp 2.301-2.309.
- Gilbert, S.F. (1989) Develomental biology. Sinaver Associates, Inc. Publishers Sunderlad, Massachusetts 720 pp.
- Hällström, I; J. Magnusson y C Ramel (1982) Relation between the somatic toxicity of dimetylnitrosamine and genetically determined variation in the level induction of citochrome P450 in Drosophila melanogaster. Mutat. Res. 92:61-168.
- Hartman, P. (1981) The aging process. Proc Natl. Acad. Sci (USA) 78:7124-7128.
- Hengeved, L. (1989) Dynamics of biological invasions. Chapman and Hall Eds. Gran Bretaña 160 pp.
- Hernández, M.R; M.J. Gally (1981) Plantas medicinales. Arbol. México. 254 pp.

- Hodgson, E. y R. Randy (1991) Insect cytochrome P450. En: Molecular aspect of monooxygenases and bioactivation of toxic compounds. Arinc, E; J. B. Schenkman y E. Hodgson (Eds). Vol 202. Plenum Press. Nato Series. pp 75-91.
- Index Merck (1989) Encyclopedia of chemical and drugs. Published by Merck and Co; Inc. Rahway. Nueva York. 11 ed. 1606 pp.
- Jacobs, M.M; T.S. Mathey y C.A. Griffin (1977) Inhibitory effects of selenium on the mutagenicity of 2-acetylfluorene (AAF) and AAF derivates. Cancer Lett. 2:319-322.
- Kada, T., T. Inoue (1978) Antimutagenic actions of vegetable factor (s) on the mutagenic principle of tryptophan pyrolysate. Mutat. Res. 53:351-353.
- Kada, T; T Inoue y N. Namiky (1982) En: Enviromental mutagenesis and plant biology. (E.J. Klekowski, Ed). Praeger, Nueva York, pp. 137-151.
- Kilbey, B.J; D.J. MacDonald; F.S. Sobels y E.W. Vogel (1981) The use of Drosophila melanogaster in test for environmental mutagens. Mutat. Res. 85:141-146.
- Klaassen, C.D. (1975) Absortion, distribution and excretion of toxicans En:L.J. Casarett y J. Doull (Eds.). Toxicology, the basic science of poisons. Macmillan Pub. Nueva York. Co. pp 26-44.
- Krebs, J.K. (1988) Estudio y distribución de la abundancia. Ed. Harla. México 753 pp.
- Kulkarni, A.P. y E. Hodgson (1980) Multiplicity of cytochrome P450 in microsomal membranes from the housefly Musca domestica. Biochem. Biophys. Acta. 263:573-588.

- Laval J; S. Boiteux y T.R. O'Connor (1990) Physiological properties and repair of apurinic/apyrimidic sites and imidazole ring opened guanine in DNA. *Mutat. Res.* 233:73-79.
- Lee, K.S; K. Tagahara; H. Suzuki; R.Y. Wu; M. Haruna y I.H. Hall (1981) Antitumor agents . 49. Tricin, Kaempferol-3-O-B-D-Glucopyranoside and (+)-Nortrachelogenin, antileukemic principles from Wikstroemia indica. *J. Nat. Prod.* 5:530-535.
- Lee, K.S; H. Nozaki; I.H. Hall; R. Ryoji; T. Hirayama; H. Suzuki y R.Y. Wu. (1982) Antitumor agents 60 Maytansine, an antileukemic principle from Maytenus diversiflora. *J. Nat. Prod.* 4:509-510.
- Lindsley, D.L. y R. Grell (1968) Genetic variations of Drosophila melanogaster. Carnegie Institution of Washington Publication Washington. 472 pp.
- Lindsley, D.L. y G. Zimm (1990) The genome of Drosophila melanogaster. Parte 4: Genes L-Z, balancers, transposable elements. *Dros. Inf. Serv.* 68:382 pp.
- Loprieno, N. (1980) General principles of genetic toxicology and methods for mutagenesis assessment. En: *The Principles and Methods Modern Toxicology*. (C.L. Galli; S.D. Murphy y R. Paoletti, Eds.) Elsevier, Holanda.
- Margison, G.P. y P.J. O'Connor (1979) Nucleic acid modification by N-Nitroso compounds, En: *Chemical carcinogens and DNA* (P.L. Grover, Ed) CRC Press, Boca raton (Florida), Vol. I, 111-160.
- Mollet, P. y F.E. Würglér (1974) Detection of somatic recombination and mutation in Drosophila: a method for testing genetic activity of chemical compounds. *Mutat. Res.* 25:421-424.

- Moutschen, J. (1985) Introduction to genetic toxicology. Jonh Wiley & Sons. Nueva York. 184 pp
- Nöthiger, R. (1970) Sucrose density separation: a method for collecting large number of Drosophila larvae. Dros. Inf. Serv. 45:177.
- Novic, A. y L. Szilard (1952) Anti-mutagens. Nature 170:926-927.
- Obe, G. A.T. Natarajan (1982) Mechanisms of the origin of structural chromosomal aberrations, En: D. Muller, A.T. Natarajan, G. Obe y G. Rohrborn (Ed). Sister chromatid exchange test. Thiene stratton Inc. Nueva York. pp 1-5.
- Ordaz, T.M.G. (1991) Valoración de la prueba para detección de mutación y recombinación somática (SMART) en las células del ojo de Drosophila melanogaster. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias. UNAM. 96 pp.
- Orozco, S.P.G. (1993) Efecto protector de la vitamina E y de los b-Carotenos en contra de la mutagenicidad de la Mitomicina-C (MMC) en la prueba somática de ala de Drosophila melanogaster. Tesis de Maestría. Facultad de Ciencias. UNAM. 109 pp.
- Pomerai, D.D. (1990) From gene to animal: An introduction to the molecular development. Cambrigde de University Press. 2 ed. Nueva York. 417 pp.
- Pratt, W. y M. Ruddon (1979) The anticancer drugs. Nueva York Oxford University Press. Nueva York. 323 pp.
- Ramel, C. (1986) Deployment of short-term assays for the detection of carcinogens: genetic and molecular considerations. Mutat. Res. 168:327-342.

- Ramos, M. P; M.H.M. Abundis; O.J.C. Gaytán; T.M.G. Ordas; S.P.G. Orozco; L.J. Maldonado; A.J. Hernández; C.E. González; M.P. Reyes; M.E.M. Galicia y M.A. Muñoz (1993) Manual de laboratorio de genética para Drosophila melanogaster. Mc Graw-Hill. México. 131 pp.
- Roberts, D.B. (1986) Drosophila a practical approach. IRL. Press. Oxford. England. 295 pp.
- Rodríguez-Arnaiz R. y M.P. Ramos (1992) Drosophila como sistema para detectar agentes genotóxicos. Serie de Genética: los pequeños manuales. Prensa de Ciencias. Facultad de Ciencias. UNAM. 50 pp.
- Rzendowski, J. (1988) Vegetación de México. Ed. Limusa México 432 pp.
- Sainsbury, M. (1979) Natural products in the fight against cancer. Chem. Brit. 15:127-130.
- Sarin, J.P.S; H.S. Garg; N.M. Khanna y M.M. Dhar (1973) Ipomoea rosida: A new glycoside from Ipomoea leari with anticancer activity. Phytochemistry. 12:2461-2468.
- Saul, R.L. y B.N. Ames (1986) Background levels of DNA damage in the population. En: Mechanisms of DNA damage and repair: implications for carcinogenesis and risk assessment. M.G. Simic; L.Grossman y A.C. Upton, (Eds.), Plenum press, Nueva York. pp 529-536.
- Sorsa, M.K. y H. Vainio (1982) Biologic monitoring of exposure to chemical mutagens in the occupational environment. Teratog Carcinog. Mutag. 2:137-150
- Stock, J.A. (1970) Chemoterapy of cancer. Chem Brit.. 6(1): 11-16.

- Szabad, J; I. Poos; G. Polgar y G. Hejja (1983) Testing the mutagenicity of malondialdehyde and formaldehyde by the Drosophila mosaic and the sex-linked recessive lethal tests. *Mutat. Res.* 113:117-133.
- Thomson W.A.R. (1980) Las plantas medicinales. Blume. México. 220 pp.
- Waters, M.D; A.L. Brady; H.F. Stack y H.E. Brockman (1990) Anti-mutagenicity profiles for some model compounds. *Mutat. Res.* 238:57-85.
- Wilkins, A.S. (1986) Genetic analysis of animal development. Wiley. Nueva York. 546 pp.
- Würgler, F. E. y E. W. Vogel (1986) In vivo mutagenicity testing using somatic cells of Drosophila melanogaster. En: Chemical mutagens principles and methods for their detection. (De serres, F.J. Eds). Plenum Press. Nueva York Vol. 10. pp 1-71.
- Vogel, E.W. (1974) Some aspect of detection of potential mutagens in Drosophila. *Mutat Res.* 29:241-250.
- Vogel, E.W. (1992) Genotoxic chemicals an introduction into the basic principles of genetic toxicology. Laboratorium voor Stralengenetica en Chemische Mutagenese. RU Leiden, Sylvius Laboratoria. (Curso).
- Vogel, E.W. (1987) Somatic cell mutagenicity in Drosophila melanogaster in comparison with genetic damage in early germcell states. *Mutat. Res.* 180:189-200.

- Vogel, E.W. y A.T. Natarajan (1979 a) The relation between reaction kinetics and mutagenic action of mono-functional alkylating agents in higher eukaryotic systems. I: Recessive letal mutations in Drosophila. Mutat. Res. 62:51-100.
- Vogel, E.W. y A.T. Natarajan (1979 b) The relation between reaction Kinetics and mutagenic action of mono-functional alkylating agents in higher eukaryotic systems. II: Total and partial sex chromosome loss in Drosophila. Mutat. Res. 62:101-123.
- Vogel, E.W. y A. Szakmary (1990) Basic principles and evaluation of results of assays measuring genotoxic damage in cell of Drosophila. The Netherlands. Mutation and the Environmental. pp 149-158.
- Vogel, E.W. y J. A. Zijlstra (1987) Mechanistic and metodological aspects of chemically induced somatic mutation and recombination in Drosophila melanogaster. Mutat. Res. 182:243-264.
- Zijlstra, J.A. (1987) Pharmacological and mechanistic aspects of chemically induced mutagenesis in Drosophila melanogaster. Tesis Doctoral. Drup: Krips Repro Meppel. 192 pp.