



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CAMPUS IZTACALA

AISLAMIENTO DEL VERBASCÓSIDO DE LA *Buddleja scordioides* Y SU EVALUACIÓN GENOTÓXICA POR MEDIO DE LA PRUEBA DE MUTACIÓN Y RECOMBINACIÓN SOMÁTICA EN ALA DE *Drosophila melanogaster* CRUZA BIOACTIVACIÓN ELEVADA.

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
LICENCIADO EN BIOLOGIA
P R E S E N T A :
HECTOR LOPEZ DIONICIO

ASESOR:
M.EN C. MARIA EUGENIA HERES PULIDO



IZTACALA

MÉXICO, D.F. 2002

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AISLAMIENTO DEL VERBASCÓSIDO DE LA *Buddleja scordioides* Y SU EVALUACIÓN GENOTÓXICA POR MEDIO DE LA PRUEBA DE MUTACIÓN Y RECOMBINACIÓN SOMÁTICA EN ALA DE *Drosophila melanogaster* CRUZA BIOACTIVACIÓN ELEVADA.

Héctor López Dionicio.

ÍNDICE.

1. Introducción.	IZT.	1
1.1. Pérdida de ozono en la estratosfera.		1
1.2. La piel humana.		2
1.2.1. Estructura y Función de la Piel.		2
1.2.2. Propiedades protectoras de la piel.		3
1.3. Radiación Solar.		4
1.4. Radicales libres.		6
1.4.1. Formación de radicales libres.		6
1.4.2. Fuentes fisiológicas de radicales libres.		6
1.4.3. Reacciones de Desintoxicación.		6
1.4.4. Sistemas fisiológicos de defensa frente a la producción de radicales libres.		6
1.4.5. Enzimas específicas.		6
1.4.5.1. La super peróxido dismutasa (SOD).		6
1.4.5.2. Catalasa.		7
1.4.5.3 Glutato peroxidasa.		7
1.4.6. Captadores de radicales libres.		7
1.4.7. Daño producido por radicales libres.		7
1.5. Fotoprotección.		9
1.5.1. Definición.		9
1.5.2. Historia de los filtros solares.		9
1.5.3. Filtros Químicos.		9

1.5.4. Filtros Físicos.	10
1.5.5. Filtros Orales.	10
2. Antecedentes.	11
3. Aspectos generales sobre el género <i>Buddleja</i> .	12
3.1. Distribución de <i>Buddleja scordioides</i> .	12
3.2. Descripción Botánica <i>B. scordioides</i> .	13
3.3. Uso de <i>B. scordioides</i> .	14
4. Verbascósido.	15
5. <i>Drosophila melanogaster</i> .	16
5.1. Ciclo de Vida.	17
5.2. Morfología.	18
5.3. Conducta Reproductiva.	19
6. Prueba de Mutación y Recombinación Somática (SMART) en el ala de <i>Drosophila melanogaster</i> .	20
7. Justificación.	24
8. Hipótesis.	25
9. Objetivos.	25
10. Materiales y Métodos.	26
10.1. Aislamiento del verbascósido.	26
10.2. Prueba de genotoxicidad con SMART.	27
11. Resultados y Análisis.	30
11.1. Aislamiento del verbascósido.	30
11.2. Evaluación con SMART.	32

11.3. Determinación de la coloración en la parte anteroventral del abdomen de <i>Drosophila melanogaster</i> .	34
11.4. Espectros de absorción.	37
12. Conclusiones.	44
13. Referencias.	45
14. Anexo.	52
Anexo 1. Propagación de la línea <i>mwh</i> de <i>Drosophila melanogaster</i> .	52
Anexo 2. Reconocimiento fenotípico del sexo.	53
Anexo 3. Identificación de hembras con mayor índice de fecundidad.	54
Anexo 4. Adquisición de habilidades para la colecta de huevos.	55
15. Solventes utilizados para la extracción del verbascósido.	56

LISTA DE TABLAS.

Tabla 1. Clasificación de la piel de acuerdo con la sensibilidad a la luz solar (Madhukar, 1992).	6
Tabla 2. Efectos de la radiación UV en humanos (Madhukar, 1992).	6
Tabla 3. Patologías donde intervienen los radicales libres (Droy-Lefaix, 1989).	9
Tabla. 4. Compuestos aislados a la fecha del género <i>Buddleja</i> .	12
Tabla. 5. Secuencia y duración aproximada del ciclo de vida de <i>D. melanogaster</i> en condiciones óptimas de temperatura y humedad.	18
Tabla. 6. Muestra las concentraciones de verbascósido, así como el testigo negativo que se utilizaron en la cruz de bioactivación elevada para el bioensayo SMART.	27
Tabla.7. Muestra el rendimiento y algunos aspectos fisicoquímicos del verbascósido.	30
Tabla.8. Resumen de resultados obtenidos en la prueba (SMART) en ala de <i>Drosophila melanogaster</i> alimentadas con verbascósido cruza bioactivación elevada.	32
Tabla. 9. Frecuencia, tamaño y distribución de las manchas por numero de células/individuo.	34
Tabla. 10. Certificado de análisis Hexano.	56
Tabla. 11. Certificado de análisis Alcohol Etílico.	57
Tabla. 12. Certificado de análisis Metanol.	58
Tabla 13. Certificado de análisis Diclorometano.	59

LISTA DE FIGURAS.

Figura 1. Vista tridimensional de la piel (Arenas, 1987).	3
Figura 2. Esquema del espectro electromagnético.	4
Figura 3. Distribución de la <i>B. scordioides</i> en México.	14
Figura 4. <i>B. scordioides</i> .	14
Figura 5. Estructura molecular del verbascósido.	15
Figura 6. Macho y hembra de <i>Drosophila melanogaster</i> .	16
Figura 7. Ciclo de vida de <i>Drosophila melanogaster</i> .	17
Figura 8. Distribución de los discos imagales en la larva y los órganos que forma en el adulto (Rusell, 1988).	19
Figura 9. Patrón de venas que divide el ala de <i>D. melanogaster</i> para el registro de las manchas (García-Bellido y Merriam, 1979).	20
Figura 10. Fenotipo de las manchas analizadas en las alas (donadas por Frei, 1997).	22
Figura 11. Testigo (-) etanol 2% coloración normal de <i>D. melanogaster</i> .	34
Figura 12. Concentración de 27mM de verbascósido coloración en la parte anteroventral.	34
Figura 13. Concentración de 81mM de verbascósido coloración en la parte anteroventral.	34
Figura 14. Concentración de 135mM de verbascósido coloración en la parte anteroventral.	34

LISTA DE GRÁFICAS.

- Gráfica 1. Muestra la producción de huevos por las hembras de *D. melanogaster*. 19
- Gráfica 2. Frecuencia de manchas por individuo después de alimentar a las larvas de 72 h con etanol 2% y verbascósido 27, 81 y 135 mM. 33
- Gráfica 3. Frecuencia, tamaño y distribución de las manchas por individuo en los experimentales y el testigo. 33
- Gráfica 4. Muestra la correlación positiva entre los tratamientos y la coloración de la parte anteroventral en los organismos dada por los espectros de absorción. 43

LISTA DE CROMATOGRAMAS.

Cromatograma 1. Estándar del verbascósido.	37
Cromatograma 2. Estándar del ácido cafeico.	38
Cromatograma 3. Testigo (-) etanol 2%.	39
Cromatograma 4. Verbascósido a 27 mM.	40
Cromatograma 5. Verbascósido a 81 mM.	41
Cromatograma 6. Verbascósido a 135 mM.	42
Cromatograma 7 Verbascósido a 27, 81 y 135 mM.	43

LISTA DE ESPECTROS UV.

Espectro UV 1. Estándar del verbascósido.	37
Espectro UV 2. Ácido cafeico.	38
Espectro UV 3. Testigo (-) etanol 2%.	39
Espectros UV 4. (a y b) del verbascósido a 27 mM.	40
Espectros UV 5. (a y b) del verbascósido a 81 mM.	41
Espectros UV 6. (a y b) del verbascósido a 135 mM.	42

LISTA DE ABREVIATURAS.

RUV	Radiación ultravioleta.
RUV-B	Radiación ultravioleta con una longitud de onda de 320 a 400nm.
RUV-A	Radiación ultravioleta con una longitud de onda de 290 a 320nm.
RUV-C	Radiación ultravioleta con una longitud de onda de 290nm.
nm	Nanometros.
cm ³	Centimetros cubicos.
Kg	Kilogramo.
ADN	Ácido Desoxiribonucleico.
CCB	Carcinoma de células basales.
CCE	Carcinoma de células escamosas.
OH	Grupo químico oxidrilo.
P450	Complejo enzimático responsable de la desintoxicación.
SOD	Super peróxido dismutasa.
ARN	Ácido rubonucleico.
PABA	Ácido para amino benzoico.
INI	Instituto Nacional Indigenista.
IMSS	Instituto Mexicano del Seguro Social.
cm	Centimetros.
DMSO	Dimetilsulfóxido.
mm	Milimetros.
mg	Miligramos.

SMART	Prueba de Mutación y Recombinación Somática.
<i>Flr</i> ³	La línea <i>flr</i> ³ / TM3, <i>Bd</i> ^S (<i>flare</i>): Se caracteriza por la presencia de tricomas mal formados, cortos en forma de flama.
<i>mwh</i>	La línea <i>mwh/mwh</i> (<i>mutiple wing hair</i>): Presenta una mutación recesiva localizada en el brazo izquierdo del cromosoma 3(3-0.3). Su expresión fenotípica se observa como un cambio del número de tricomas que salen por célula (3-5).
<i>Bd</i> ^S	<i>Bd</i> ^S (<i>serratia</i>): Para reconocer fenotípicamente a la línea se utiliza este marcador dominante, que se manifiesta como muescas en los bordes de las alas.
TM ³	TM3 (Inversión TM3): Como los marcadores <i>flr</i> ³ y <i>Bd</i> ^S son letales en homocigosis la línea presenta un cromosoma balanceador con inversiones múltiples (TM3), que evita la recombinación en meiosis y mitosis y permite mantener la línea.
OR(R)	Esta línea presenta el cromosoma 2 de la línea Oregon R(R) resistente al DDT (Delgado Rodríguez, <i>et al.</i> , 1995), este cromosoma a su vez acarrea la mutación dominante Rst (2) DDT ubicada en 2-65 la cual confiere no solo resistencia al DDT e insecticidas órgano fosfóricos en larvas y adultos sino también el incremento general en el metabolismo xenobiótico.
DDT	1,1- (2,2,2-Trichloroethylidene) bis (4- Chlorobenzene); 1,1,1-Trichoro-2,2-bis(p-chorophenyl) ethane.
Ho	Hipótesis nula
Ha	Hipótesis alterna.
mM	Milimoles.
lts	Litros.
MeOH	Metanol.
g	Gramos.
rpm	Revoluciones por minuto.
ccf	Cromatografía de capa fina.
LD ⁵⁰	Dosis media letal.

ml	Militros.
HPLC	Cromatografía líquida de alta presión.
μl	Microlitros.
μg	Microgramos.

AGRADECIMIENTOS.

Al Laboratorio de Genética Toxicológica.

Al Laboratorio de Fitoquímica de la Unidad de Biotecnología y Prototipos.

Al Laboratorio de Histología de la Unidad de Morfofisiología.

Al Laboratorio de Biogeoquímica de la Unidad de Biotecnología y Prototipos.

Al Laboratorio de Microbiología de la Unidad de Biotecnología y Prototipos.

A todos los profesores que durante estos dos años me brindaron su apoyo, enseñanza y confianza y muy en especial a Maria Eugenia Contreras López por todo su apoyo, amistad y asesoría técnica.

DEDICO ESTA TESIS.

A mis Padres: **Valentín López Hernández** y **Avelina Dionicio Figueroa** por su apoyo incondicional y por toda una vida de amor y de unión ejemplo a seguir.

A mis Hermanos: **Elizabeth**: quien me ha enseñado a tener paciencia y ser mejor día a día.

Gustavo: quien con su ejemplo de tenacidad me ha demostrado que es lo que hace a un gran hombre.

Valentín: que con toda su enseñanza me ha hecho el hombre que soy.

Ricardo: por enseñarme las matemáticas, muchas materias más y la vida.

Y por todo su cariño y su ejemplo de excelencia que siempre les ha caracterizado y les permite ser los mejores.

A ti mi amor: **Yolanda Pérez Nájera** por tus sabios consejos, tiempo y por estar a mi lado en los buenos y malos momentos. POR TODO GRACIAS AMOR.

A la familia Contreras López.

A mis amigos: Israel, Mauricio, Ismael, Felipe, María Eugenia, Cecilia, Claudia Monserrat, Jorge, Marisol, Cilia, Verónica, Sandra, Gabriel y todos aquellos que compartieron el tiempo y el espacio conmigo.

**Gracias por elegir la dirección contraria,
la del Salmón que frente a la corriente
sublima la vida y la especie.**

Bienvenidos salmones a nadar contra la corriente.

**Me quedo con la compañía de mis más antiguos amigos
que se atrevieron a llegar hasta el final del río...
a todos ellos gracias (Calamaro, 2000).**

1. INTRODUCCIÓN.

1.1. Pérdida de ozono en la estratosfera.

En años recientes se ha puesto mayor atención a los cambios en el ambiente que son resultado de las actividades humanas. Los términos: adelgazamiento de la capa de ozono, elevación de los niveles de dióxido de carbono, clorofluorocarbonos y lluvia ácida, con mucha frecuencia encabezan artículos científicos y populares. Físicos atmosféricos y otros investigadores han estudiado el impacto de estos cambios en la salud.

La función principal del ozono es la absorción de la RUV en una banda centrada en 250 nm, pero extendiéndose a 350 nm. Esto lleva a una reducción del 50% de la RUV-B que llega a la superficie de la Tierra y una mucho menor proporción de RUV-A. Esta acción y la liberación de energía como calor juegan un papel importante en el control de la temperatura atmosférica (Fernández, 1994).

La concentración de ozono se mantiene por el balance de su producción y destrucción, desde luego que en los últimos años el equilibrio se ha perdido por una mayor destrucción de la capa de ozono que permite el paso de la RUV hasta la corteza terrestre.

Existen tres grupos principales de compuestos químicos que han sido involucrados en la destrucción gradual de la capa de ozono de la estratosfera:

- A). Compuestos nitrogenados que surgen principalmente del óxido nitroso.
- B). Compuestos hidrogenados provenientes principalmente de metano y vapor de agua.
- C). Compuestos halogenados de los cuales los principales son los clorofluorocarbonos.

Si bien estos tres grupos se producen en forma natural, las actividades humanas y numerosas sustancias químicas sintéticas han incrementado sus concentraciones. Estos compuestos se difunden rápidamente de la troposfera a la estratosfera como gases inertes, pero por el efecto de la RUV se convierten en compuestos inestables, algunos catalizan la destrucción del ozono y otros caen a la superficie terrestre como lluvia ácida.

La pérdida de ozono en la estratosfera es un hecho bien demostrado con consecuencias en la salud. Por este motivo se ha incrementado el

desarrollo de filtros solares para que absorban la RUV-B con el fin de minimizar los efectos nocivos de la radiación sobre el cuerpo humano.

En los climas áridos y semiáridos la incidencia de la RUV es intensa por lo que se puede suponer que las especies vegetales dominantes en estos hábitats presentan compuestos muy eficientes tanto en la filtración de las radiaciones solares así como en los mecanismos antioxidantes.

México es uno de los países con mayor biodiversidad, sin embargo, ésta no se ha aprovechado, en gran medida por la falta de estudios básicos. Además las zonas áridas y semiáridas constituyen una parte importante del territorio nacional, el cual tiene muchas especies potencialmente aprovechables, sin embargo la gran mayoría de éstas presentan problemas de mercado (García, 1998).

Es necesario ampliar los estudios ecológicos, fitoquímicos y genotóxicos para aumentar el conocimiento de los productos derivados de las especies vegetales que presenten propiedades antioxidantes y sean eficientes en la filtración de las radiaciones solares y que además no tengan efectos tóxicos o genotóxicos para su posible explotación industrial.

El aislamiento de principios activos a partir de plantas tiene una estrecha relación con la producción industrial, farmacéutica y/o cosmética de diferentes sustancias químicas con diferentes aplicaciones. Se han extraído compuestos a partir de productos naturales, como el verbascósido del arbusto *Buddleja scordioides* (Avila, 1999). Se ha propuesto que este compuesto se utilice como ingrediente de filtros solares para uso humano.

1.2. La piel humana.

Aun cuando el rigor del sistema tegumentario comprende un sistema externo o piel y un tegumento interno o mucosa, colindantes ambos en forma insensible a nivel de los orificios naturales del cuerpo- boca, ano, vagina-, es costumbre considerarlo solamente en su composición primera, o sea, como piel y anexos (Cárdenas, 1983).

La piel de un adulto promedio cubre más de 19,300 cm³ de área superficial, pesa alrededor de 2.7 kg y recibe más o menos una tercera parte de toda la sangre que circula por el cuerpo. La piel es casi impermeable, proporciona una barrera térmica estrechamente regulada y eficaz; además no sólo controla la pérdida de fluidos valiosos. También evita la penetración de sustancias extrañas que pueden ser nocivas, refleja parte de las radiaciones solares y actúa como amortiguador frente a golpes mecánicos. También aporta señales sexuales y sociales por su color, textura y olor (Stanley, 1982; Moore, 1982; Arroyo, 1994).

1.2.1. Estructura y Función de la Piel.

La piel está compuesta de una gran variedad de tipos celulares, como se observa en la fig.1. Presenta una estructura compleja formada por diferentes capas, las cuales son la epidermis, dermis (dermis reticular) e hipodermis. La epidermis es una capa de epitelio estratificado que está conectada al tejido conjuntivo (dermis); ésta se encuentra encima de una base de tejido adiposo que forma la hipodermis (Leeson *et al.*,1989; Rusell,1992).

El color de la piel en sí es amarillo, debido a la presencia de carotenos, pigmentos que se depositan en el estrato córneo y en las células de grasa de la dermis y la hipodermis. La sangre que se observa a través de la dermis le da un tono rojizo. Por lo último la presencia de cantidades variables de melanina explica los tonos de color pardo. La melanina es producida por células especializadas de la epidermis, los melanocitos. Los factores ambientales como la RUV aumentan la producción de melanina y por lo tanto el bronceado (Leeson *et al.*,1989).

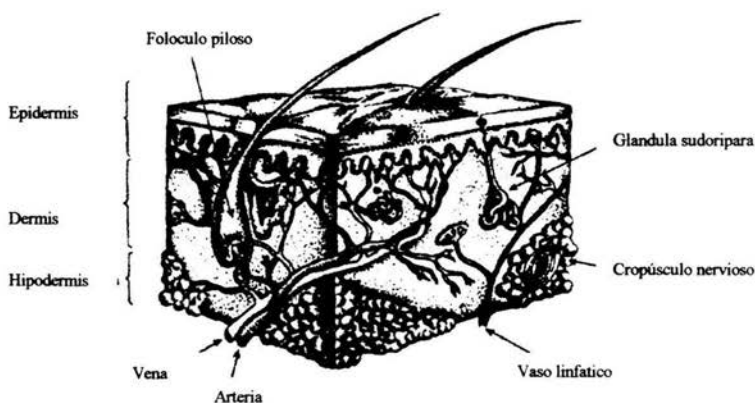


Fig.1 Vista tridimensional de la piel (Arenas, 1987).

1.2.2. Propiedades protectoras de la piel.

La piel impide el paso de agua al interior de los tejidos. La epidermis impide la lesión de las estructuras subyacentes y, al recubrir las terminaciones sensibles en la dermis, mitiga el dolor. Cuando se destruye la epidermis, como sucede en las quemaduras de tercer grado, se pierde esta protección, y todo contacto es doloroso ya que en la piel están localizados los receptores sensitivos específicos para las cuatro sensaciones fundamentales que son: dolor, tacto, temperatura y presión (Pearce, 1981; Arroyo, 1994).

1.3. Radiación Solar.

Uno de los principales factores ambientales a los que está expuesta la piel es la radiación solar, la cual se divide en rayos gamma, rayos x (la exposición a esta alta energía no es de manera natural, sino inducida por el ser humano), ultravioleta, luz visible, infrarrojo y ondas cortas, como se muestra en la fig.2 (Madhukar,1992).

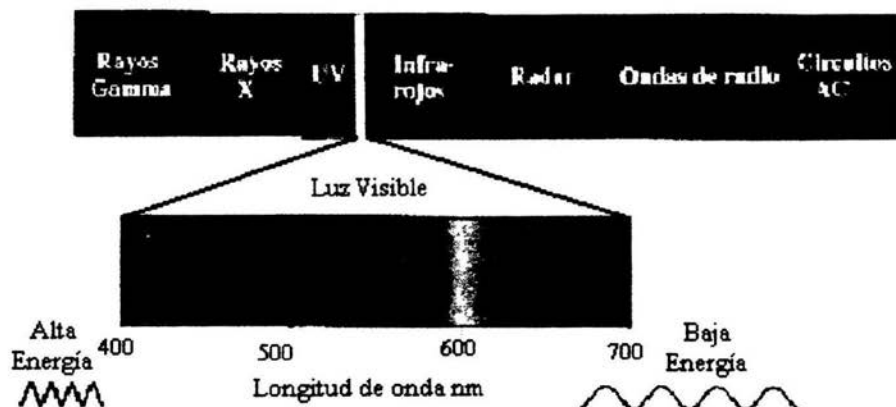


Fig.2. Esquema del espectro electromagnético.

La radiación ultravioleta (RUV) se divide en: RUV-A (320-400 nm), RUV-B (290 a 320 nm) y RUV-C (290 nm) (Larson, 1988).

La región RUV-A (320 nm) causa la pigmentación excesiva de la piel o melanogénesis (bronceado), la RUV-B provoca eritema, edema, quemaduras de piel, estimula la pigmentación y provoca dímeros de pirimidina en el ADN de las células epiteliales. La RUV-C es absorbida por el ozono en la atmósfera por lo que no incide en la superficie terrestre, sin embargo hay lámparas comerciales que tienen esta longitud de onda, las cuales se emplean como germicidas (Freeman *et al.*, 1989).

La energía solar en los humanos es muy importante ya que promueve la síntesis de vitamina D. La deficiencia de ésta vitamina conduce a un metabolismo anormal del calcio y fósforo que provoca una formación defectuosa de los huesos como es en el caso del raquitismo.

La energía solar estimula la producción de melanina, la cual ayuda a controlar los efectos nocivos provocados por una exposición prolongada a la radiación solar (Madhukar,1992).

Las dosis excesivas la radiación solar, sobre todo en la región del ultravioleta, tiene efectos nocivos como por ejemplo: el carcinoma de células basales y el carcinoma de células escamosas.

La intensidad de la radiación depende de la latitud y altitud geográfica, la hora de exposición en el día, y de la condición de la capa de ozono (Larson, 1988), así que al disminuir esta última, aumenta la radiación que llega a la superficie terrestre y con ello el daño en la piel (Russell, 1992).

Se ha determinado que la disminución de 1% en la capa de ozono, provoca un aumento de hasta 2% en la RUV-B, por lo que el actual adelgazamiento o desaparición de la capa de ozono ha incrementado en el riesgo de carcinomas cutáneos de un 1% a 4% en la última década (Russell, 1992).

La sensibilidad de la piel a la radiación solar está determinada genéticamente por el color y la facultad de respuesta a la radiación por diversos mecanismos de defensa como la fotoreparación del ADN (Leeson *et al.*, 1989; Freeman *et al.*, 1989). En mamíferos la reparación de los dímeros de timina se realiza por escisión de nucleótidos (Friedberg *et al.*, 1995).

La piel humana se clasifica de acuerdo a su sensibilidad a la luz solar como se observa en la tabla 1. Mientras que en la tabla 2 se muestran algunos efectos provocados por la RUV, aunque existen diversos mecanismos que le permiten a la piel impedir los daños causados por esta radiación, los cuales son:

a) Queratinización. Se forma el estrato córneo de la piel, el cual contiene proteínas que absorben la RUV.

b) Pigmentación. Se secreta melanina por los melanocitos, en la epidermis.

c) Acumulación de carotenoides. En la epidermis y la hipodermis, se acumulan los carotenos, los cuales actúan como estabilizadores de membranas y como antioxidantes.

d) Superóxido dismutasa y peroxidoreductasa. Disminuyen el efecto de la radiación UV eliminando radicales libres.

e) Mecanismos de reparación del ADN. Eliminan el daño causado al ADN por la radiación, disminuyendo el riesgo de cáncer. (Madhukar, 1992; Friedberg *et al.*, 1995).

Tipo de piel.	Color de la piel sin exponerse al sol.	Sensibilidad a la luz UV.	Bronceado.
I.	Blanco.	Muy sensible +++++.	Siempre enrojece pero nunca broncea.
II.	Blanco.	Muy sensible ++++.	Siempre enrojece, rara vez broncea.
III.	Blanco.	Sensible +++.	Enrojece moderadamente, bronceado uniforme.
IV.	Café claro.	Moderadamente sensible ++.	Enrojece poco, bronceado marrón.
V.	Café.	Minimamente sensible +.	Enrojece rara vez, bronceado chocolate.
VI.	Negro.	Insensible.	Nunca enrojece, raza negra o hindúes.

Tabla 1. Clasificación de la piel de acuerdo con la sensibilidad a la luz solar (Madhukar, 1992).

Efectos Agudos.	Efectos Crónicos.
Quemaduras.	Arrugas en la Piel.
Neomelanogénesis.	Cáncer (melanomas y carcinomas).
Reacciones Fotoalérgicas y Fototóxicas.	Alteraciones de la Respuesta Inmune.
Enfermedades foto sensitivas (Lupus, Porfiria).	

Tabla 2. Efectos de la radiación UV en humanos (Madhukar, 1992).

A pesar de los mecanismos de protección ya mencionados, la radiación UV se ha relacionado con diversas enfermedades de la piel que van desde la formación de eritema, melanogénesis y envejecimiento prematuro hasta cáncer de piel como son: el carcinoma de células basales (CCB) y el carcinoma de células escamosas (CCE) este tipo de cáncer es muy común en los Estados Unidos (Epstein, 1997; Freeman *et al.*, 1989).

1.4. Formación de radicales libres.

Dentro de las moléculas los electrones habitualmente se reúnen en pares. Así en la molécula del agua, el Oxígeno se encuentra rodeado de cuatro pares de electrones; dos pares se ligan débilmente en uniones OH y dos pares no ligados. Un doblete electrónico es más estable que un electrón aislado, porque aparentemente dos electrones con carga opuesta permiten la anulación de sus campos magnéticos recíprocos. Un radical libre es por el contrario, una especie química neutra o cargada donde la capa periférica contiene un electrón no acoplado (electrón no apareado con otro electrón). El número total de electrones de un radical libre es por consiguiente impar. El electrón no acoplado le confiere al radical libre una cierta inestabilidad tanto en el plano energético como en el cinético (Buechter, 1988).

1.4.1. Fuentes fisiológicas de radicales libres.

La producción de radicales libres es permanente dentro de la materia viviente, pero lo esencial de la producción de radicales está asociado con el metabolismo celular del oxígeno y las reacciones de óxido-reducción.

1.4.2. Reacciones de Desintoxicación.

Las reacciones oxidativas de desintoxicación son igualmente productoras de radicales libres. Las oxidasas contenidas en los peroxisomas (organelos celulares que juegan un papel importante en la desintoxicación de numerosas moléculas) son el origen de una producción de radicales por la transformación del oxígeno molecular en el anión superóxido y en peróxido de hidrógeno. Los citocromos P450 de retículo endoplásmico liso, son las proteínas que funcionan, como las oxidasas, para transferencias monoeléctricas (producción de radicales) y participan en la desintoxicación de ciertos productos (anestésicos, pesticidas, contaminantes, etc.), así como en la biosíntesis de esteroides (cortisol, aldosterona, etc) (Buechter, 1988).

1.4.3. Sistemas fisiológicos de defensa frente a la producción de radicales libres.

1.4.4. Enzimas específicas.

Frente a la producción fisiológica más poderosa de radicales libres oxigenados, el organismo dispone de sistemas de defensa enzimáticos específicos, manteniendo en concentraciones muy bajas a los radicales libres.

1.4.4.1. La super peróxido dismutasa (SOD).

La SOD está presente en todos los organismos animales y vegetales vivientes aerobios. En el hombre existen dos super óxidos dismutasas, una

está en el citoplasma y su sitio activo contiene cobre y zinc; la otra es mitocondrial y contiene magnesio. La acción de la SOD debe obligatoriamente estar acoplada a las catalasas/peroxidasas para evitar la acumulación de peróxido de hidrógeno H_2O_2 (Deby y Pincemail, 1986).

1.4.4.2. Catalasa.

Enzima localizada en el interior de los peroxisomas, su función es la de catalizar la transformación de peróxido de hidrógeno en agua y en oxígeno molecular. La actividad de esta enzima está delimitada por su localización exclusiva en los peroxisomas (Deby y Pincemail, 1986).

1.4.4.3. Glutato peroxidasa.

La glutatión-peroxidasa es una enzima citosólica e intramitocondrial que degrada la mayor parte de peróxido de hidrógeno y lo transforma, en presencia de glutatión reducido, en agua y glutatión oxidado. La glutatión-peroxidasa juega un papel antioxidante y capta los radicales libres después de realizar una transformación. (Deby y Pincemail, 1986).

1.4.6. Captadores de radicales libres.

Los captadores de radicales son un sistema de protección complementaria, además de las enzimas, que son a la vez citosólica (glutatión, ácido ascórbico) y membranal (alfa-tocoferol, vitamina A). La característica común de estos compuestos es ser fácilmente oxidables. El alfa-tocoferol o vitamina E capta los radicales de tipo $ROO\cdot$ en el lugar mismo de su formación (localización membranal de alfa-tocoferol) y evita así eficazmente a la lipidoperoxidación de las membranas celulares (Bisby, 1990).

1.4.7. Daño producido por radicales libres.

Los radicales de oxígeno tienen la capacidad de dañar reversible o irreversiblemente a compuestos pertenecientes a todas las clases bioquímicas, incluyendo ácidos nucleicos (ADN y ARN), proteínas y aminoácidos libres, lípidos y lipoproteínas, carbohidratos y macromoléculas del tejido conjuntivo. Estas alteraciones pueden tener impacto sobre el funcionamiento celular, tales como el metabolismo y la expresión genética (Gerschman *et al.*, 1954; Friedberg *et al.*, 1995).

Los radicales libres pueden modificar la estructura de algunos aminoácidos debido a esto las proteínas pierden su actividad biológica. En las proteínas se pierden los enlaces disulfuro y son más susceptibles a la proteólisis por lo que pierden su función.

En lo referente a la interacción con el ácido desoxirribonucleico (ADN) cambian su estructura, formando dímeros de pirimidina, originando rupturas en las bandas del ADN y daños en los factores de transcripción, afectando la regulación en la expresión de ciertos genes (Larson,1988; Pryor, 1994).

Los radicales libres reaccionan con los lípidos provocando la lipoperoxidación lo cual afecta a las membranas celulares produciendo lisis (Larson,1988; Pryor, 1994).

En la última década se ha obtenido amplia evidencia que indica que los radicales de Oxígeno tienen cierta ingerencia en el desarrollo de muchas enfermedades, algunas de ellas se muestran en la tabla 3. Sin embargo su participación en muchos procesos patológicos como porfiria, dermatitis por contacto y en el síndrome de Bloom, todavía es controvertido (Cross *et al.*, 1987; Athar *et al.*, 1992; Beindic,1994).

Patología.	Atención.
Patología cardiovascular.	Isquemia. Aumento en la agregación plaquetaria. Arteriosclerosis.
Neuro-geriatria.	Alzheimer, Parkinson.
Oftalmología.	Las degeneraciones retinianas, cataratas, enfermedades inflamatorias del ojo, la fibroplasia retrolental.
Otorrinolaringología.	Vértigos. hipoacusias. acúfenos.
Diabetología.	Diabetes.
Dermatología y Reumatología.	Infecciones cutáneas, enfermedades auto-inmunes
Patología Digestiva.	Enfermedad de Crohn.
Oncología.	Tumores.

Tabla 3. Patologías donde intervienen los radicales libres (Droy-Lefaix ,1989).

1.5. Fotoprotección.

Para prevenir o reducir los efectos nocivos de la radiación UV es necesario tomar medidas fotoprotectoras como evitar la exposición prolongada a las horas de mayor irradiación (10 a.m. a 3 p.m.), emplear ropa protectora como sombreros, paraguas y lentes para el sol, favorecer el bronceado natural con exposiciones cortas o suberitemogénicas (formadoras de eritema o enrojecimiento), administrar productos químicos que aumenten las defensas naturales de la piel y el empleo de filtros solares, los cuales pueden ser tópicos u orales (Bissett, 1991).

1.6.1. Definición.

Los filtros solares son preparaciones tópicas cosméticamente aceptables, que reducen en mayor o menor grado, el efecto deletéreo de las radiaciones UV por absorción, reflexión o dispersión de las mismas. Los filtros solares no deben de ser productos de uso ocasional y deben tener otros beneficios para la piel como la humectación, emoliencia, sustantividad y, desde luego, una fotoprotección eficaz (Bissett, 1991).

1.6.2. Historia de los filtros solares.

El primer reporte de uso de filtros solares en el mundo fue en 1928, en los Estados Unidos con la introducción comercial de una emulsión conteniendo dos filtros solares químicos, bencil salicilato y bencil cinamato. Alrededor de 1930, un producto que contenía 10% de salol (fenil salicilato) apareció en el mercado australiano. En Francia, 1936, fue introducido el primer filtro solar comercial por E. Schueller. En los Estados Unidos aparecieron lociones conteniendo oleato de quinina y bisulfato de quinina en 1935. El ácido para amino benzoico (PABA) fue el primer filtro solar patentado en 1943, abriendo el camino para la incorporación de varios derivados de para amino benzonatos en las formulaciones de filtros solares. Durante la segunda guerra mundial el petrolato rojo fue usado por el ejército de Estados Unidos, que guiaron el uso extensivo de filtros UV físicos y químicos (Lowe, 1990).

1.6.3. Filtros Químicos.

Son preparaciones incoloras las cuales se colocan sobre la piel. Normalmente contienen compuestos químicos que absorben todas las UVs (290-400 nm), modifican las propiedades ópticas de la piel y previenen las reacciones fotoquímicas y bioquímicas responsables de la inducción de quemaduras solares, además, protegen del envejecimiento prematuro (Madhukar, 1992).

1.6.4. Filtros Físicos.

También se les llama bloqueadores, no absorben la luz, reflejan la radiación UV y la visible. Normalmente son sustancias con color, opacas, que se adhieren a la piel y no se caen después de nadar. No son aceptados cosméticamente, pero son apropiados para pacientes que son muy sensibles a la radiación UV y a la visible o para personas que por condiciones laborales exponen mucho tiempo a la radiación solar (Madhukar,1992).

1.6.5. Filtros Orales.

La mayoría de la gente no se aplica filtros solares tópicos en su vida diaria, por lo que se ha tratado de desarrollar protectores solares sistémicos, los cuales reducen definitivamente los efectos de la radiación. Compuestos como el ácido acetilsalicílico y las vitaminas A, C y E se emplean ampliamente, sin embargo su supuesta fotoprotección no ha sido determinada, sólo el P-caroteno se ha recomendado en pacientes con porfiria (Madhukar,1992).

2. Antecedentes.

El género *Buddleja* tienen amplia distribución, tanto en el hemisferio oriental como en el occidental. Las plantas de dicho género se caracterizan por vivir en una amplia diversidad de hábitats, incluyendo zonas perturbadas por efecto de la urbanización. Las especies más comunes son *B. davidii*, *B. americana*, *B. cordata*, *B. globosa* y *B. variabilis*. Los estudios fitoquímicos han revelado la presencia de numerosos metabolitos y en algunos casos se ha evaluado su actividad biológica como se muestra en la tabla 4.

Compuestos.	Referencia.
Sesquiterpenos: Buddleina A, B y C que son citotóxicas y Buddleina D y E no tóxicos	Yoshida <i>et al.</i> , 1978.
Triterpenos: β -amirina, acetato de β -amirina	López <i>et al.</i> , 1979.
Esteroles: β -sitosterol, condriasterol, estigmasterol	Houghton, 1984.
Iridoides: aucubina, catalpol, metilcatalpol. Fenilpropanoides: ácido cafeico, ferúlico y p-cumárico, Buddlnol A, B, C, D, E y F, Verbascósido, martinósido, jionósido, angorósido. Fenilpropanoides: ácido cafeico, ferúlico y p-cumárico, Buddlnol A, B, C, D, E y F, Verbascósido, martinósido, jionósido, angorósido. Feniletanides: éster 2-(-4 hidroxifenil etanol del ácido lignosérico, éster 2-(-4 hidroxifenil) etanol del ácido dodecanoico	Houghton, 1985.
Buddlejasaponinas I-IV	Yamamoto <i>et al.</i> , 1991.
Iridoides unidos a lignanos: 6-feruloilajugol	Yamamoto, 1993.
Diterpenos: Buddlejona, primer diterpeno aislado de la familia BUDDLEJACEAE	Houghton, 1996.
Aisló los compuestos químicos encontrados en <i>B. pasiflora</i> los cuales son: Verbascósido, aucubina y metil catalpol	Arciniegas <i>et al.</i> , 1997.
Determino el efecto bactericida del verbascósido contra una bacteria gram-positiva y determino su modo de acción.	Avila, 1999.

Tabla. 4. Se muestran los compuestos aislados a la fecha del género *Buddleja*.

3. Aspectos Generales sobre el género *Buddleja*.

Anteriormente el género *Buddleja* estaba considerado dentro de la familia *Loganiaceae*; ahora de acuerdo con Hutchinson de 1973, pertenece a la familia *Buddlejaceae*. El género *Buddleja* comprende alrededor de 100 especies, 50 de las cuales son originarias del continente americano.

Las especies de *Buddleja* son árboles pequeños o arbustos que crecen en las tierras tropicales de América, Asia y África.

Los usos medicinales de estas plantas reportados a nivel mundial son como antiinflamatorio, antiséptico local y como diurético (Houghton, 1984).

En México existen 20 especies de *Buddleja*, las cuales se distribuyen en todo el territorio nacional (Rzedowski, 1985). Algunas de estas plantas son utilizadas en la medicina tradicional mexicana para el tratamiento de la erisipela, como cicatrizantes, analgésicos, antidiarreicos, antiinflamatorios y contra infecciones de las vías respiratorias altas (INI, 1994).

Son pocos los estudios químicos y biológicos que se han realizado a las *Buddlejas* que habitan en México y que permitan correlacionar la composición fitoquímica con las propiedades medicinales que se les atribuyen.

El IMSS (1994) publicó un Atlas con plantas medicinales, en este la especie *Buddleja scordioides* presenta muy pocos estudios científicos que comprueben sus propiedades, en el sentido de su empleo tradicional.

Avila (1999) aisló verbascósido de la especie *Buddleja scordioides* y debido a la absorbancia en el espectro UV que presentó el compuesto, que fue de 290 nm lo propone como un ingrediente activo para los filtros solares para uso humano.

Estos son los únicos estudios reportados para las especies de *Buddleja* de nuestro país.

3.1. Distribución de *Buddleja scordioides*.

La *Buddleja scordioides* H.B.K. es cosmopolita y tiene una amplia distribución en las zonas áridas de nuestro país, desde Chihuahua hasta el suroeste de Hidalgo como se muestra en la fig.3, habitando zonas desérticas de los Estados Unidos. En los estados del norte del país se le conoce con el nombre de "escobilla" o "tepozán" (IMSS, 1994).



Fig.3 Distribución de la *B. scordioides* en México.

3.2. Descripción Botánica *B. scordioides*.

Buddleja scordioides es un arbusto de 30 cm a un metro de altura, ramoso y de tallo leñoso, sus hojas son sésiles pequeñas con margen crenado (0.25-0.0 cm) de largo y (0.8 cm) de ancho y con venación muy conspicua en el envés. Presenta inflorescencia terminal con varios pares de cimas capitadas colocadas en axilas foliares, con cabezuelas sésiles (Rzedowski y Rzedowski , 1985).



Fig.4. *B. scordioides*.

3.3. Uso de *B. scordioides*.

Esta planta es utilizada artesanalmente para fabricar escobas, el cocimiento de sus hojas se utiliza contra la indigestión y para prevenir las quemaduras de piel producidas por la exposición prolongada a la luz solar (Rzedowski y Rzedowski, 1985), hasta la fecha no ha sido estudiada genotóxicamente.

4. Verbascósido.

En general los compuestos fenilpropanoides se reconocen como parte del mecanismo de defensa químico usado por las plantas en respuesta a un ataque por patógenos, además de su papel general como agentes antimicrobianos. La mayoría de los ésteres glucósidos fenilpropanoides poseen actividad farmacológica o biológica (Cooper *et al.*, 1980).

A algunos compuestos químicamente relacionados con el verbascósido se les ha determinado actividad biológica. El orobancósido tiene un efecto analgésico; el miricósido un efecto antialimenticio. Un gran número de compuestos se han reportado como inhibidores enzimáticos efectivos; por ejemplo, el orobancósido inhibe la aldosa reductasa que al parecer juega un papel importante en la disminución de las cataratas y neuropatías secundarias en los diabéticos. El forsiácido y su análogo hidroxilado, el cual inhibe la actividad cAMP-fosfodiesterasa (Nishibe *et al.*, 1982; Kitagawa *et al.*, 1984). Otros ésteres cafeoil glucósidos inhiben la actividad 5-lipoxigenasa del ácido araquidónico y de los leucotrienos, de ahí que se usen como agentes antialérgicos o como antiinflamatorios.

El verbascósido obtenido de la planta *Buddleja scordioides* es un metabolito secundario del tipo fenilpropanoide (Avila, 1999), que se caracteriza por tener una parte de cafeoil y una hidroxifeniletal unidas a una β -glucosa por una unión éster (C-4) y un enlace glucosídico (C-1) la estructura molecular se muestra en la Fig. 5. La parte fenilpropanoide deriva de la fenilalanina o del ácido cinámico y el fragmento hidroxifeniletanol, se forma a partir de la tirosina y de la tiramina (Ibahim y Barrón, 1989).

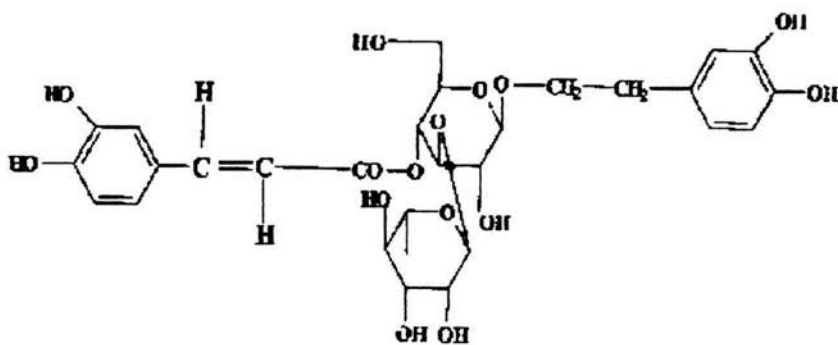


Fig. 5. Estructura molecular del verbascósido.

Es soluble en metanol (CH_3OH), metanol-agua en una proporción 1:1 ($\text{CH}_3\text{OH}-\text{H}_2\text{O}$), en dimetilsulfóxido (DMSO) y es parcialmente soluble en agua (H_2O).

5. *Drosophila melanogaster*.

Es un organismo eucarionte, multicelular, perteneciente al orden Díptera, dioico, su reproducción es sexual y tiene una longitud de 2-3 mm. Morfológicamente es diferente el macho de la hembra como se puede ver en la fig. 6.

Las hembras depositan los huevos en los sitios apropiados para el desarrollo de las larvas, las cuales están desprovistas de patas verdaderas, su locomoción se efectúa por movimientos de los segmentos, ayudados por cerdas, espinas o crecimientos carnosos del cuerpo. La gran mayoría de las larvas son acéfalas o no tienen cabeza bien formada.

La pupa de los dípteros es cerrada, en ésta existe un puparium, es decir, que la larva forma su pupa sin despojarse de la última exuvia y el adulto presenta generalmente un ptilinum (forma como emerge el imago de ellas).

Una mosca adulta hembra mide 2-5 mm de largo y pesa 1.5 mg mientras que el macho pesa .8 mg aproximadamente. Los ojos de la hembra contienen un promedio de 780 omatidios y los del macho, alrededor de 740. (Graf y Schaik, 1992).

La mosca de la fruta ha probado por diversas razones ser un organismo experimental muy valioso, algunas de ellas son: ciclo vital corto, su composición genética de sólo cuatro pares de cromosomas, así como cromosomas muy grandes en las células de sus glándulas salivales (Ramos *et al.*, 1993).

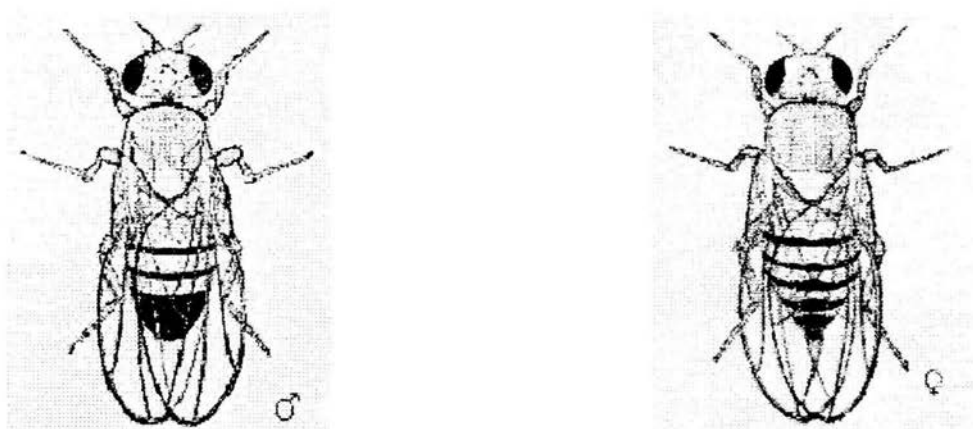


Fig. 6. Macho y hembra de *Drosophila melanogaster*.

5.1. Ciclo de Vida.

Aunque en condiciones de laboratorio el ciclo de vida es muy corto, este organismo en su medio natural presenta un ciclo de vida ligeramente más largo; de acuerdo a las condiciones del medio natural, en un medio donde la alimentación está asegurada el ciclo de vida de este organismo se reduce.

El tiempo de vida de *Drosophila melanogaster* a 25°C de temperatura es de aproximadamente 40 días como se muestra en la fig.7, presentando en este lapso de tiempo diferentes estadios a etapas de desarrollo ontogénico que se muestran en la tabla 5.

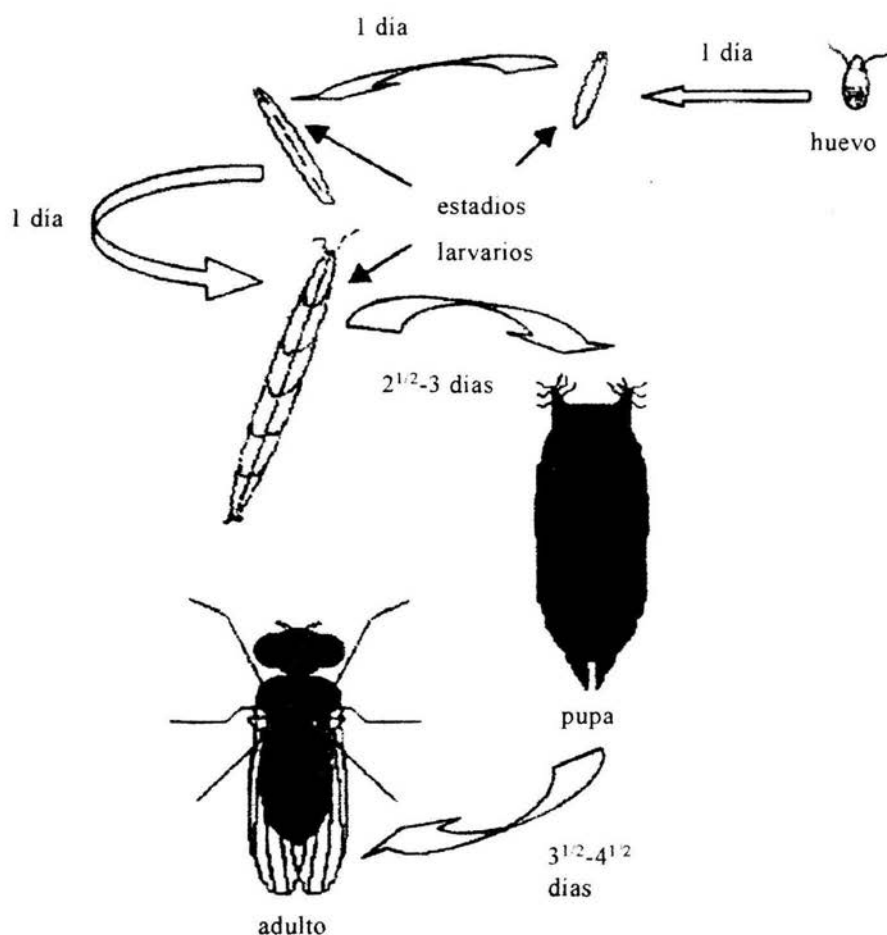


Fig.7. Ciclo de vida de *Drosophila melanogaster*.

Etapa de Desarrollo.	Numero de Eventos.	Días.
Desarrollo Embrionario.	1.	1.
Primera Etapa Larval.	2.	1.
Segunda Etapa Larval.	3.	1.
Tercera Etapa Larval.	4.	2.
Prepupa.	5.	1/6.
Pupa	6.	4.5.
Etapa Adulta.	7.	10 días.

Tabla. 5. Secuencia y duración aproximada del ciclo de vida de *Drosophila melanogaster* en condiciones óptimas de temperatura y humedad.

Los huevos depositados por este organismo son de color blanco, alargados y presentando dos filamentos en la región anterodorsal, con un tamaño promedio de 0.5 mm x 0.3 mm.

5.2. Morfología.

La morfología de la *D. melanogaster*, su comportamiento y particularidades fisiológicas se han estudiado minuciosamente. Desde el punto de vista genético, los discos imagales constituyen un excelente material de estudio. Cada disco aparece como un primordio desde el primer estadio larvario, con 20 a 50 células. A partir de ese momento, el número de células por cada disco se incrementa por mitosis hasta el final de la fase larvaria en la que llega a tener miles de células por disco. Al final del tercer estadio larvario, 5 días aproximadamente después de la eclosión, la larva inicia el periodo de pupa en el que parte del material larvario degenera y las células indiferenciadas forman los tejidos y las estructuras del adulto. Estos derivan de cada disco imagal, cuya distribución se muestra en la fig. 7. Durante este estadio la cutícula que constituye el puparium se oscurece y 5 días más tarde emerge la mosca adulta. Aproximadamente de 6 a 8 horas después de emerger los machos son fértiles, mientras que las hembras lo son después de 10 ó 12 horas (Mitchell, 1984).

En la parte superior de la cabeza se encuentran: un par de antenas, tres ojos pequeños llamados ocelos. El tórax de la *D. melanogaster* está formado por tres segmentos fusionados, que son: el protórax que posee el primer par de patas, el mesotórax en que se articula el segundo par de patas, y las alas y el metatórax con un tercer par de patas y un par de estructuras llamadas halterios que le dan al organismo estabilidad mientras se encuentran en vuelo y el abdomen en el cual se encuentra el aparato genital en la parte posterior (Russell, 1992).

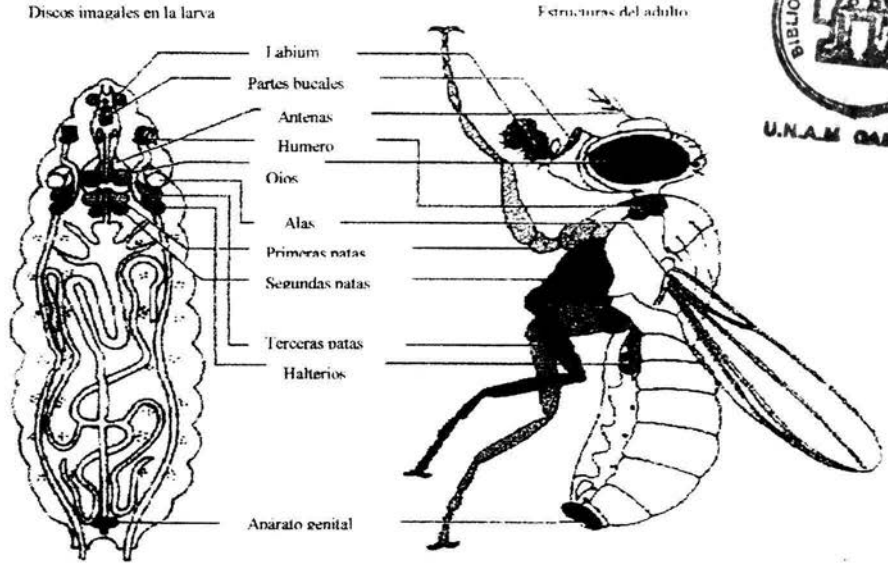
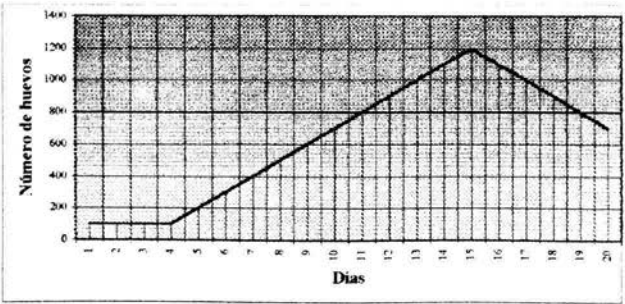


Fig. 7. Distribución de los discos imagales en la larva y los órganos que forma en los adultos (Rusell, 1988).

5.3. Conducta Reproductiva.

IZT.

Las hembras depositan sus huevos en la superficie del medio de cultivo y el rango de producción de huevos se incrementa drásticamente durante los primeros días de la vida del adulto. En este tiempo (entre el 4o. y 15avo. día) se puede incrementar la producción a 1000 huevos por día, así una hembra puede poner hasta 3 000 huevos en su tiempo de vida aunque es más común entre 700 y 1 000. El rango de producción de los huevos empieza a decaer después de los 15 a 20 días; por lo tanto el comportamiento es exponencial (David y Bocquet, 1974).



Gráfica 1. Muestra la producción de huevos por las hembras de *Drosophila melanogaster*.

6. Prueba de Mutación y Recombinación Somática en el ala de *D. melanogaster*.

Los estudios epidemiológicos han demostrado ser muy eficientes para determinar la relación de enfermedades con sus causas probables, permitiendo tener a un nivel clínico, una guía para el diagnóstico y prevención de las mismas. Sin embargo, no son totalmente confiables, ya que no se puede determinar el periodo aproximado de exposición al factor de riesgo, ni controlar las actividades y hábitos de cada individuo, haciendo difícil centrar en un sólo aspecto el origen de la enfermedad. Ante tales circunstancias se ha tenido la necesidad de diseñar modelos experimentales para el estudio de posibles agentes mutagénicos directos o indirectos denominados bioensayos a corto plazo, cuyos resultados han sido de gran utilidad en el cuidado de la salud pública. En dichas pruebas se expone al organismo, al cultivo de células o fagos, en forma controlada, al agente genotóxico sospechoso. Uno de los bioensayos a corto plazo que ha dado grandes resultados es la prueba de mutación y recombinación somática (SMART, por sus siglas en inglés), la cual detecta mutaciones puntuales, deleciones y algunos tipos de aberraciones cromosómicas como mutación y recombinación somática provocadas por algún agente físico o químico, utilizando como modelo experimental a *D. melanogaster* (Guzmán y Graf, 1995).

Las alas de *D. melanogaster* están formadas por dos monocapas celulares, una dorsal y otra ventral. El plano de división de las células está orientado de manera perpendicular al eje del ala, de manera que los eventos que regulan a las células de la capa dorsal son independientes de aquellos de la capa ventral. En la fig. 8 se muestra el patrón de venas del ala de *D. melanogaster* que ayuda a realizar el registro y contabilización de las manchas por sección. Al diferenciarse, cada célula da origen a un tricoma que se forma por la acumulación de fibras de actina en un polo de la célula, el tricoma crece durante la metamorfosis y posterior a ésta, la célula muere y sólo es observable la presencia del tricoma en la superficie de las alas. De esta manera puede establecerse una relación directa entre el número de tricomas en las células de las alas y el número de células que los forman (Demerec, 1965; García Bellido y Merriam, 1971; García Bellido y Dapena, 1974).

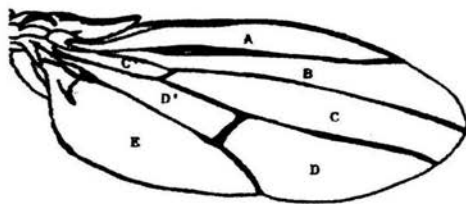


Fig. 8 Patrón de venas que divide el ala de *Drosophila melanogaster* para el registro de las manchas (García-Bellido y Merriam, 1979).

La prueba SMART, utiliza sistemas fenotípicos: mutaciones en las células de los tricomas en las alas. Teniendo como fundamento, la pérdida de heterocigosidad de genes marcadores en las células de los discos imaginales de las larvas, que se expresan como clones o manchas en las alas. Al exponer a las larvas a un compuesto sospechoso, si hay daño en el material genético, éste se puede determinar mediante métodos estadísticos, al comparar la frecuencia de manchas en los tejidos correspondientes, con la obtenida en organismos no expuestos (Guzmán y Graf, 1995).

En el caso de trabajar con las células de las alas, se utilizan tres líneas: *mutiple wing hair* (*mwh/mwh*), *flare* (*flr³/TM3, Bd^S*) y *Oregon-flare* (OR(R), *flr³/TM3, Bd^S*).

La línea *mwh/mwh* (*mutiple wing hair*): Presenta una mutación recesiva localizada en el brazo izquierdo del cromosoma 3(3-0.3). Su expresión fenotípica se observa como un cambio del número de tricomas que salen por célula (3-5), mientras que en el fenotipo silvestre a cada célula le corresponde un solo tricoma.

La línea *flr³/ TM3, Bd^S* (*flare*): Se caracteriza por la presencia de tricomas mal formados, cortos en forma de flama o roseta de maíz, es una mutación recesiva y esta localizada en el brazo izquierdo del cromosoma tres pero en una posición más próxima al del anterior (3-38.8). Esta mutación en homocigosis es letal (Ramos *et al.*, 1993). Sin embargo, las células individuales homocigóticas en los discos imaginales de las alas son viables y pueden producir clones mutantes en las células del alas del adulto (Graf, *et al.*, 1984).

Bd^S (*serratia*): Para reconocer fenotípicamente a la línea se utiliza este marcador dominante, que se manifiesta como muescas en los bordes de las alas; en condiciones de homocigosis también es letal. Se localiza en el cromosoma 3 (3-92.5) (Ramos *et al.*, 1993).

TM3 (Inversión TM3): Como los marcadores *flr³* y *Bd^S* son letales en homocigosis la línea presenta un cromosoma balanceador con inversiones múltiples (TM3), que evita la recombinación en meiosis y mitosis y permite mantener la línea, la cual está formada por individuos heterocigotos para los marcadores letales (Graf, *et al.*, 1984).

OR(R) (*Oregon-flare*): La línea *Oregon-flare* fue construida por Frölich y Würzler en 1989. Esta línea presenta el cromosoma 2 de la línea Oregon R(R) resistente al DDT (Delgado Rodríguez, *et al.*, 1995), este cromosoma a su vez acarrea la mutación dominante Rst (2) DDT ubicada en 2-65 la cual confiere no solo resistencia al DDT e insecticidas órgano fosfóricos en larvas y adultos sino también el incremento general en el metabolismo xenobiótico (Lindsley & Zimm, 1992 citada en Delgado, *et al.*, 1995).

Esta mutación es responsable de incrementar de manera constitutiva los niveles en el gen regulador de la síntesis del Citocromo P-450, complejo enzimático que participa activamente en la oxidación y reducción metabólica de diferentes compuestos inactivando o activando promutágenos (Delgado, *et al.*, 1995).

Es importante mencionar que el utilizar marcadores localizados en el mismo cromosoma, permiten discernir fenómenos de recombinación en la región delimitada por el marcador *flr*³ y el centrómero o la región entre los dos marcadores. Como resultado de eventos de recombinación pueden recobrase manchas sencillas y gemelas. Este último evento es el resultado de recombinación en el intervalo próximo al centrómero que es acotado por el marcador *flr*³, mientras que las manchas sencillas *flr*³ o *mwh* indican varios eventos posibles: recombinación entre *flr*³ y *mwh*, mutación puntual, pérdida parcial o total del cromosoma 3 o por una disyunción.

En las cruzas, las larvas transheterocigotas tienen un fenotipo *mwh*^{+/+}*flr*³ o *mwh*^{+/+}*flr*³/TM3,*Bd*^S, en teoría en proporción 1:1. Ambas larvas son indistinguibles, pero al recuperar adultos, el primer genotipo genera moscas con alas silvestres y el segundo alas *serratia*, siendo las primeras las que se analizarán en busca de manchas sencillas (resultado de varios eventos mutagénicos y de recombinación somática) y de manchas gemelas (que resultan solamente de la recombinación somática) como se aprecia en la Fig 9.

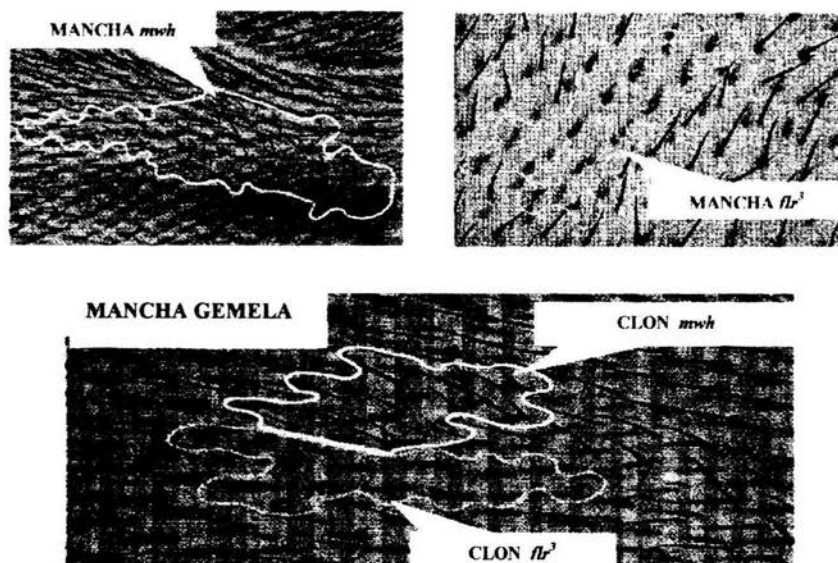


Fig.9. Fenotipo de las manchas analizadas en las alas (donadas por Frei, 1997).

7. Justificación.

El 6% de la radiación solar aproximadamente que alcanza la superficie de la tierra es radiación UV (Pathak, 1995) y el efecto más nocivo provocado por la exposición prolongada a la radiación solar es la inducción de dos tipos de cáncer, por este se ha desarrollado una fuerte campaña para la elaboración de productos que se puedan aplicar en la piel y que permitan incrementar el tiempo de exposición del ser humano a la radiación solar.

En México tradicionalmente se han utilizado plantas para problemas de salud o incluso para evitar las quemaduras por la exposición prolongada a la radiación solar. Al igual que en los filtros solares se encuentran en estas sustancias activas que son utilizadas por la población.

Por esto es necesario ampliar los estudios tanto ecológicos, fitoquímicos y genotóxicos para diversificar los productos derivados de las especies que presenten propiedades aptas para ser explotadas por el hombre a un nivel industrial.

Sin embargo la falta de estudios sobre la toxicidad de la molécula verbascósido, hace pensar en la necesidad de evaluar este compuesto ya que su aplicación podría tener un efecto nocivo para el ser humano. Por lo anterior en este proyecto se plantea: aislar un metabolito secundario del tipo fenilpropanoide (verbascósido) de la *Buddleja scordioides* y evaluar el efecto genotóxico del verbascósido mediante la prueba de mutación y recombinación somática en ala de *D. melanogaster* cruza de bioactivación elevada.

8. Hipótesis.

H₀ = Si el verbascósido no tiene efecto genotóxico entonces no habrá diferencias entre el testigo negativo (etanol 2 %) y los experimentales.

H_a = Si el verbascósido tiene efecto genotóxico entonces habrá diferencias entre el testigo negativo (etanol 2 %) y los experimentales

9. Objetivos.

Objetivo General.

Evaluar el efecto genotóxico del verbascósido a concentraciones que generan el 75, 85, 95% de sobre vivencia, mediante la prueba de mutación y recombinación somática en ala de *Drosophila melanogaster* cruza bioactivación elevada.

Objetivos Particulares.

I). Aislar el verbascósido de la *Buddleja scordioides*.

II). Cuantificar el rendimiento de verbascósido obtenido de la *Buddleja scordioides*.

III). Administrar soluciones 0, 27, 81, 135 mM de verbascósido a larvas de 72 h de la cruza bioactivación elevada para evaluar su genotoxicidad mediante la prueba de mutación y recombinación somática en ala de *Drosophila melanogaster*.

10. Materiales y Métodos.

10.1. Aislamiento del verbascósido.

La *Buddleja scordioides* se colectó en el Municipio del Huizache Edo. de San Luis Potosí durante el mes de abril del 2001 y se trasladó al laboratorio de Fitoquímica de la Unidad de Biotecnología y Prototipos de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala.

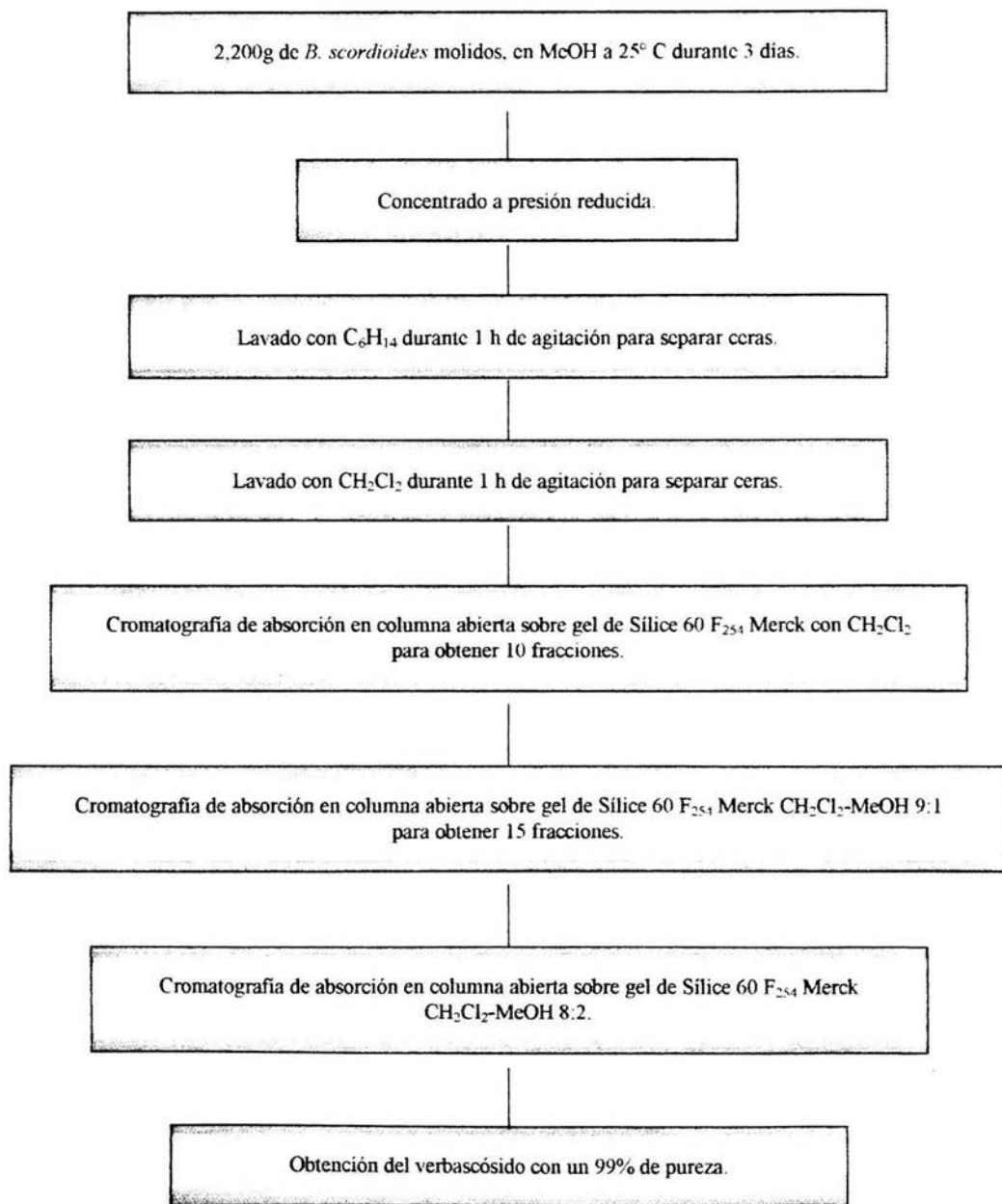
La planta se secó a la sombra a temperatura ambiente durante 20 días. Se molió la parte aérea, obteniendo 2,200 g, los cuales se colocaron en un recipiente de 20 lts, agregando 14 lts MeOH dejándolo durante 5 días a temperatura ambiente. Posteriormente se obtuvo un extracto metanólico. Este proceso se repitió 4 veces bajo las mismas condiciones.

El extracto metanólico se filtró con papel filtro Whatman M-1 y se concentró a sequedad en presión reducida en un Rotavapor BUCHI R-124 a 70 rhm y 65^o C.

El extracto se dejó reposar durante 10 días a temperatura ambiente para evaporar el MeOH y posteriormente se realizaron cinco lavados con C₆H₁₄ y tres con CH₂Cl₂.

El extracto se incorporó a celita para realizar la primera cromatografía de absorción en columna abierta. Se realizaron sobre gel de sílice 60 F₂₅₄ Merck (tamaño de partícula 0.063-0.200 mm, malla 70-230 ASTM), la fase móvil que se empleó fueron mezclas de CH₂Cl₂:MeOH aumentando gradualmente la polaridad y a una proporción de CH₂Cl₂:MeOH 8:2 se obtuvo el verbascósido. El desarrollo de la columna se monitoreo empleando cromatografía en capa fina (ccf), se emplearon cromatofolios de aluminio cubiertos con gel de sílice 60 F 254 Merck (0.2 mm de espesor, para análisis), usando como fase móvil CH₂Cl₂:MeOH 8:2. La ccf permitió verificar el desarrollo de las cromatografías en columna abierta y comprobar la pureza de 99% del compuesto obtenido.

10.1. Aislamiento del verbascósido



10.2. Prueba de genotoxicidad con SMART.

Las líneas utilizadas fueron: OR(R)*flare*, *flr*³/TM3,*Bd*^S y *mwh mwh*, del laboratorio de Genética Toxicológica de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, originalmente donadas por el Dr. U. Graf del Instituto Tecnológico de Zurich, Scherwezenbach Suiza.

Las líneas OR(R)*flare*, *flr*³/TM3,*Bd*^S, se propagaron, de las que se obtuvieron hembras vírgenes y la línea *mwh mwh* de la que se obtuvieron machos. Se realizó la cruce en un medio de levaduras fresco activado. La cruce Bioactivación Elevada, fue con: hembras OR(R)-*flr*³/TM3,*Bd*^S X machos *mwh/mwh*. Ocho horas después se colectaron los huevos y se incubaron a 25°C y 65% de humedad durante 72 horas.

Las larvas se colocaron en medio instantáneo (Carolina Biological Supply Co., Burlington NC) en donde se expusieron a un tratamiento oral crónico con las concentraciones de verbascósido que se observan en la tabla 6.

Cruza	Concentración I.	Concentración II.	Concentración III.	Testigo (-)	Testigo (+)
B. E.	135 mM.	81 mM.	27 mM.	Etanol 2 %.	Uretano 20 mM.

Tabla. 6. Muestra las concentraciones de verbascósido, así como el testigo negativo que se utilizaron en la cruce de Bioactivación Elevada para el bioensayo SMART.

Estas concentraciones corresponden al 75%, 85% y 95% de sobrevivencia respectivamente, partiendo de la LD 50 que fue de 270 mM en la línea OR(R) *flr*³/TM3,*Bd*^S y 580 mM para la línea *flr*³/TM3,*Bd*^S con verbascósido (Heres *et al.*, 2000).

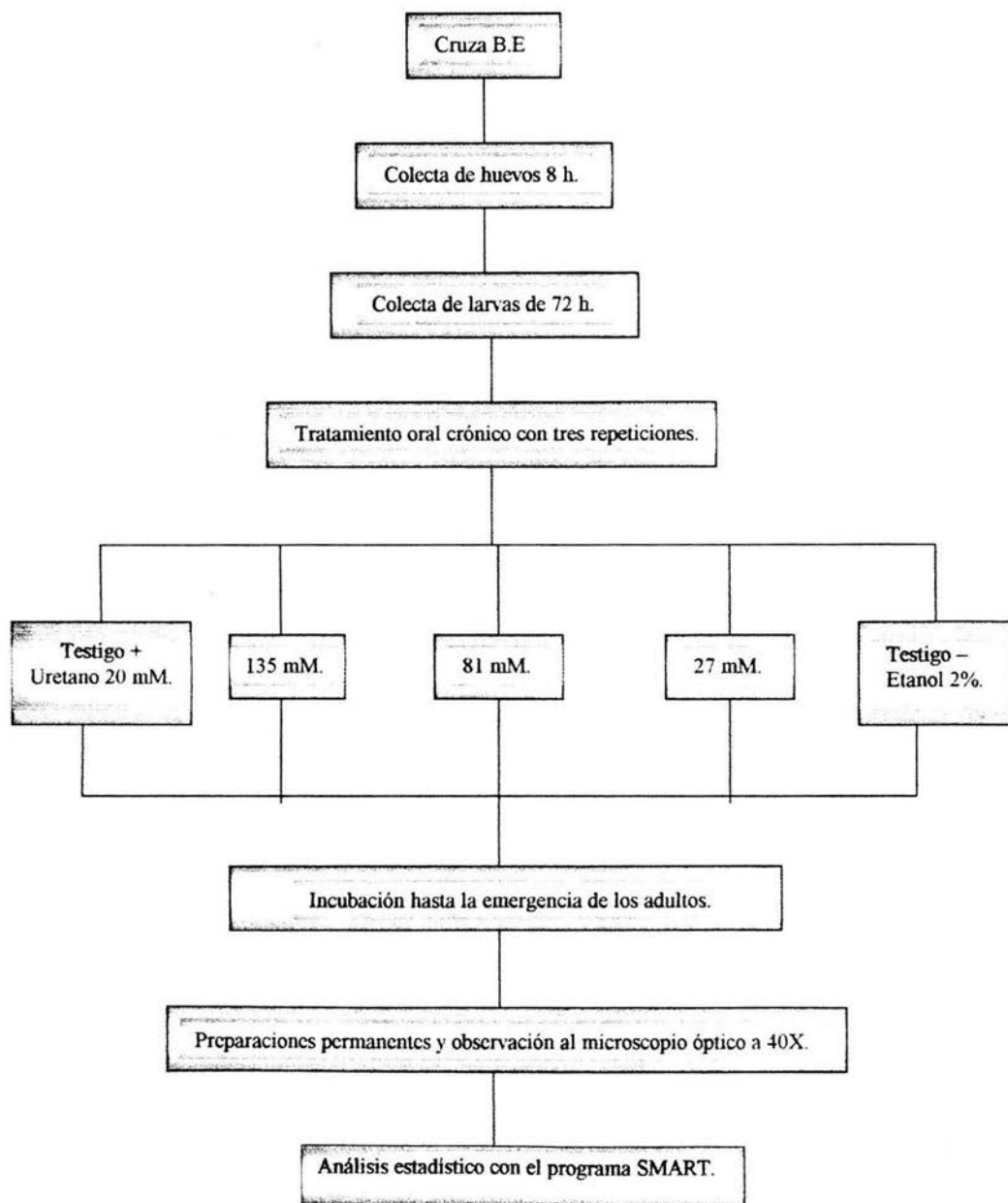
Se hicieron tres experimentos independientes con un mínimo de tres unidades experimentales por tratamiento. Cada tratamiento se realizó en condiciones controladas de temperatura (25°C) y humedad (60%-65%), hasta la emergencia de los adultos.

Los adultos se recuperaron al cabo de 10 días de la colecta de huevos, fijándose en CH₃CH₂OH al 70 %, posteriormente se disectaron las alas (con ayuda de un microscopio estereoscópico), desde la base y se montaron en porta objetos con solución de Faure y se les colocó un cubre objetos (30 g de goma arábiga, 20 ml de glicerol, 50 g de hidrato de cloral y 50 g, agua

50 ml). Después se dejaron secar, colocándolas en una parrilla a 25°C con unas pesas de 500 g para evitar que se movieran.

Una vez secas las preparaciones, se fijaron con barniz transparente. Los porta objetos se titularon con los datos necesarios para su identificación, y se observaron al microscopio óptico a una resolución de 40X para determinar la frecuencia, tamaño y tipo de mancha (Graf *et al.*, 1984). Las preparaciones se etiquetaron con un código que permitió hacer la revisión sin conocer el tratamiento del que provenían. Para evaluar la genotoxicidad del verbascósido se analizaron los resultados obtenidos con el programa estadístico SMART (Frei y Würigler, 1988) y con la prueba de U para dos colas del programa Statistica versión 6 para PC (Frei y Würigler, 1998).

10.2 Evaluación con SMART



11. Resultados y Análisis.

11.1. Aislamiento del verbascósido.

El verbascósido se obtuvo en la fracción V, cuyo eluyente fue CH_2Cl_2 -MeOH 8:2. Se obtuvieron 73.2934 g a partir de 2.200 kg de *Buddleja scordioides*. El rendimiento fue de 3.331 % del compuesto. El cual fue mayor que el reportado por Avila (1999), siendo el rendimiento de 1.890 % a partir de 1.227 kg de *Buddleja scordioides*.

Esto pudo deberse a que el tiempo de colecta fue distinto; la de mayor rendimiento fue colectada en abril del 2001, uno de los meses con mayor irradiación solar y con un rango más amplio de ésta durante el día, mientras que Avila colectó en noviembre de 1997 que es un mes que no presenta una cantidad de radiación considerable.

La identificación del verbascósido se llevó a cabo por cromatografía en capa fina y se comparó con la muestra original donada por la Instituto de Química de la UNAM. Presentando una sola mancha ambas muestras examinadas, y un r_f de 3.2142 para la muestra original, mientras la del compuesto aislado fue de 3.1034. Existiendo entre ambos una diferencia no significativa. Estos datos son el resultado del promedio de 28 cromatografías llevadas al cabo para la evaluación de las muestras.

El verbascósido es un sólido amorfo de color café. Presenta una solubilidad en metanol (MeOH), metanol-agua en una proporción 1:1 (MeOH- H_2O), dimetilsulfóxido (DMSO), etanol ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$) y es parcialmente soluble en agua (H_2O). Su coloración en solución es de color café intenso, con un olor dulce y por estudios espectroscópicos de UV presenta un UV λ max: 208 nm, 217 nm, 291 nm, y 332 nm (Avila, 1999).

Planta utilizada y gramos	g obtenidos de verbascósido	Rendimiento en %	UV λ max	Soluble	Color
<i>Buddleja scordioides</i> 2 200 g.	73.2934	3.331	208 217 291 332	metanol metanol-agua etanol dimetilsulfóxido parcialmente en agua	Café intenso

Tabla.7. Muestra el rendimiento y algunos aspectos fisicoquímicos del verbascósido.

Como resultado final del aislamiento se obtuvo un compuesto aromático, que se caracteriza por tener una parte cafeoil y una hidroxifeniletíl unidas a una β -glucosa por una unión éster en el carbono cuatro y una glucosídica en el carbono uno (Avila, 1999). El verbascósido tiene un peso molecular de 610 mol, con una pureza del 99 % y se obteniendo un total de 73.2934g suficientes para realizar los experimentos genotóxicos necesarios.

11.2. Evaluación con SMART.

Tabla.8. Resumen de resultados obtenidos en la prueba SMART en ala de *Drosophila melanogaster* alimentadas con verbascósido cruza bioactivación elevada.

Compuesto y Concentración	No. de moscas	No. de Manchas por mosca.					Clon mwh	Promedio de Ciclos de División Celular.	Frecuencia de Formación de Clones $\times 10^{-5}$.	
		Manchas Pequeñas 1-2 Células $m = 2.00$	Manchas Grandes >2 Células $m = 5.00$	Manchas Gemelas $m = 5.00$	Manchas Totales $m = 2.00$	Observado.			Corregido	
Etanol 2%.	60	0.533 (32)-	0.15 (9) -	0.02 (1) -	0.70 (42) -	42	2.29	2.9		
Verbascósido 27 mM.	60	0.55 (33)- ns	0.12 (7) - ns	0.02 (1) $p < .01$	0.68 (41) - ns	41	2.27	2.8	-0.1	
Verbascósido 81 mM.	60	0.433 (26)- ns	0.07 (4) - ns	0.05 (3) ns	0.55 (33) - ns	33	1.81	2.3	-0.43	
Verbascósido 135 mM.	60	0.383 (23)- ns	0.07 (4) - ns	0.07 (4) ns	0.52 (31) - ns	30	2.20	2.1	-0.8	
Uretano 20 mM.	45	11.87 (534) +	1.56 (70) +	0.53 (24) +	13.96 (628) +					

Diagnostico estadístico acordado por Frei y Wuergler (Mutation Res., 203 (1988) 297-308):

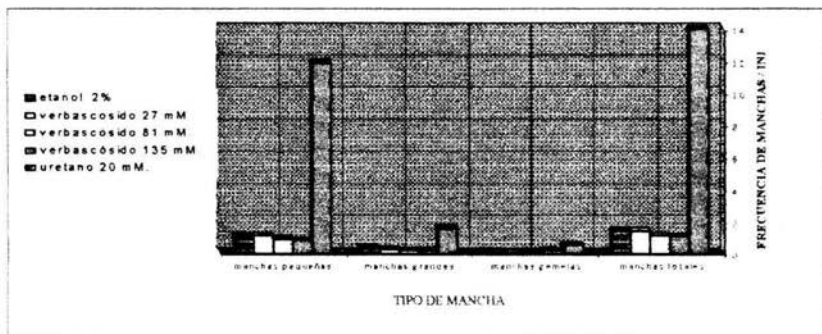
+ = **Positivo.** - = **Negativo.** w = **Falso Positivo.** i = **Indeciso.**

m = Factor de multiplicación. Niveles de Probabilidad: alpha = beta = 0.05.

$p < .01$ y ns = no significativo con la prueba de U de Mann-Whitney para dos colas Frei y Würgler (Mutation Res., 334

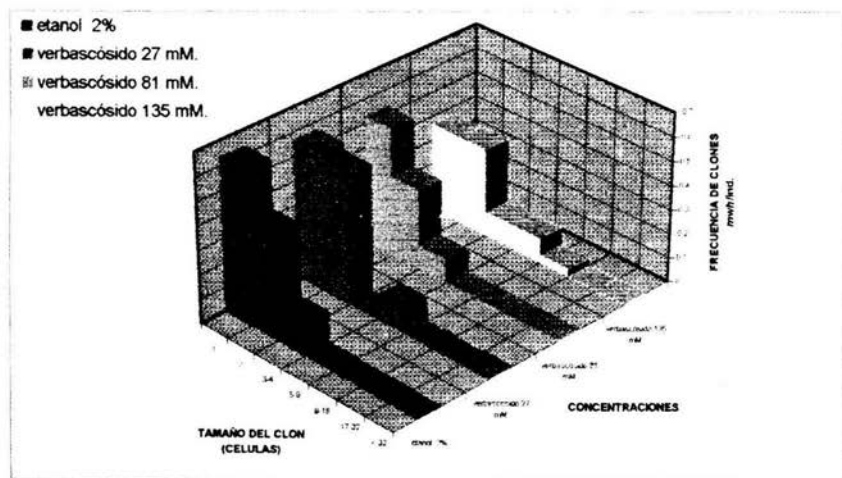
(1995) 247-258).

En la tabla 8 se muestra el resumen de los resultados obtenidos con el paquete SMART (Frei y Würgler, sin publicar), y la prueba de Mann-Whitney (Frei y Würgler, 1995). El número de manchas pequeñas, grandes, gemelas y totales encontradas en cada uno de los individuos.



Gráfica 2. Muestra la frecuencia de manchas por individuo después de alimentar a las larvas de 72 h con etanol 2% y verbascósido 27 mM, 81 mM y 135 mM.

Los resultados de SMART mostraron que la frecuencia de manchas tanto en los experimentales, como en el testigo negativo fue mayor para las manchas pequeñas, siguiendo las grandes y después las gemelas, como se observa en las tablas 8 y 9. Lo cual corresponde con lo esperado cuando no existe daño genotóxico en el organismo (Graf, 1995).



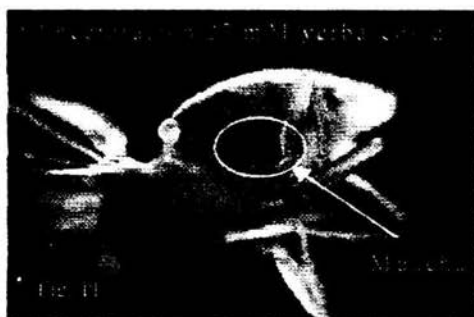
Gráfica 3. Frecuencia, tamaño y distribución de las manchas por individuo en los experimentales y el testigo. La frecuencia mayor esta en las manchas de 1 sola célula. La distribución es máxima en 27 mM y 135 mM (1 a < 33 células).

Concentración	1 célula	2 células	3-4 células	5-8 células	9-16 células	17-32 células	>32 células
Etanol 2%	0.633	0.433	0.133	0.006	0.003	0.003	0
Verbascósido 135 mM	0.366	0.366	0.1	0.1	0.03	0	0.003
Verbascósido 81 mM	0.533	0.333	0.1	0.006	0.003	0	0.003
Verbascósido 27 mM	0.566	0.533	0.006	0	0.006	0	0.003

Tabla. 9. Frecuencia, tamaño y distribución de las manchas por número de células/individuo.

11.3. Determinación de la coloración café oscuro en la parte anteroventral del abdomen de *Drosophila melanogaster*.

Del tratamiento oral crónico con verbascósido (27, 81 y 135 mM), al que fueron expuestas las larvas, se observó una coloración oscura en la parte anteroventral del abdomen de los adultos, la cual se presume que es directamente proporcional a la concentración del verbascósido al que fueron expuestas (figs. 10, 11, 12, 13) mientras que los testigos con etanol 2% no presentaron coloración alguna.



Todos los organismos del grupo testigo y los experimentales, se colectaron vivos después de haber emergido, lo cual nos indica que la coloración de la parte anteroventral del abdomen de los organismos no estaba dada por alteraciones internas, incompatibles con la vida.

Con el fin de demostrar que dicha coloración es directamente proporcional a la concentración del verbascósido se midió la absorbancia a 600 nm por HPLC (HP serie 1100) de 20 μ l de una solución 1.63 mM de verbascósido (Fig. 14, 15), una solución 5.05 mM de ácido cafeico (Figs. 16 y 17) ambos diluidos en MeOH grado HPLC. Se maceraron en MeOH 26 organismos (*D. melanogaster*) de cada uno de los tratamientos (0, 27, 81, 135 mM), se centrifugó (Eppendorf 5415C) a 14 000 rpm durante 10 min, se secaron al vacío durante tres días y cada uno de ellos se resuspendió en 200 μ l de MeOH (Fig. 18, 20, 22, 24).

El cromatograma de la concentración de 1.63 mM de verbascósido (Fig. 14) mostró un punto máximo de absorción de 332 nm, este solamente se presentó en los tratamientos de 81 y 135 mM (Figs. 22 y 24), las cuales tienen una concentración de 1.12556×10^{-2} μ g y 1.84783×10^{-2} μ g por mosca, respectivamente al calcular la concentración de acuerdo al área del punto de absorción. Mientras que en el espectro UV la concentración de 1.63 mM (Fig. 15) se aprecia la similitud entre estos tratamientos (Figs. 23 b y 25 b).

La solución 5.05 mM de ácido cafeico (Fig. 16) presentó un punto máximo de absorción de 290 nm y un espectro UV (Fig. 17) que resultó ser diferente a los espectros de los tratamientos 0, 27, 81 y 135 mM. Estos mostraron un tiempo de retención de 4.395, 4.409, 4.395 y 4.395 min y un punto máximo de absorción de 270 nm en el espectro UV (Figs. 19, 21 a, 23 a, 25 a), demostrando que estos puntos de absorción no corresponden al ácido cafeico. Por lo anterior se deduce que pueden ser resultado del maceramiento de los organismos, lo cual involucra a otros compuestos.

En la fig. 26 se muestran los cromatogramas superpuestos de los tratamientos. En ésta hay dos puntos máximos de absorción el de la derecha corresponde a las concentraciones de los puntos máximos del verbascósido que contenían los individuos tratados. Los puntos de la izquierda, como antes se ha mencionado no corresponden al ácido cafeico, que es un subproducto de la hidrólisis ácida del verbascósido.

Todo lo anterior nos indica una clara presencia de verbascósido en los individuos alimentados con 81 y 135 mM. En el tratamiento de 27 mM sólo se registraron trazas del fenilpropanoide que son despreciables desde el punto de vista químico.

El verbascósido en solución presentaba una coloración café oscura. Al añadirlo al medio instantáneo para *Drosophila*, éste adquirió esa coloración. Las imágenes (Figs. 10, 11, 12, 13) muestran el color descrito en los individuos. Todos los que emergieron de cada tratamiento lo presentaron y los espectros de absorción confirmaron la hipótesis, que a mayor concentración del verbascósido que comieron las larvas, se obtuvo mayor coloración en los adultos que emergieron y mayor concentración de la molécula completa en la región anteroventral (Gráfica 4).

11.4. Espectros de absorción.

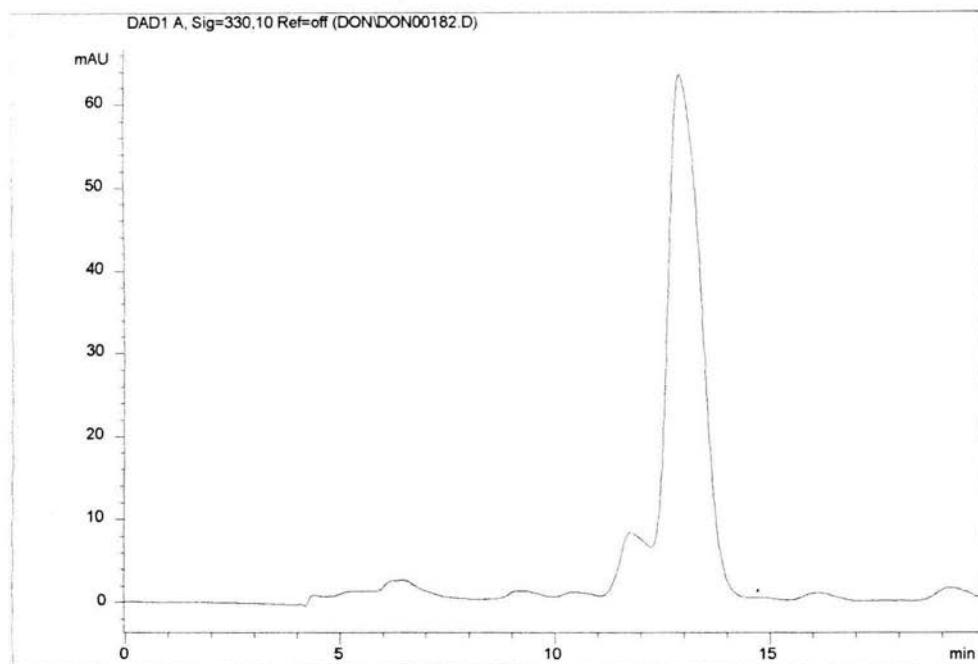


Fig. 14 Cromatograma estándar del verbascósido.

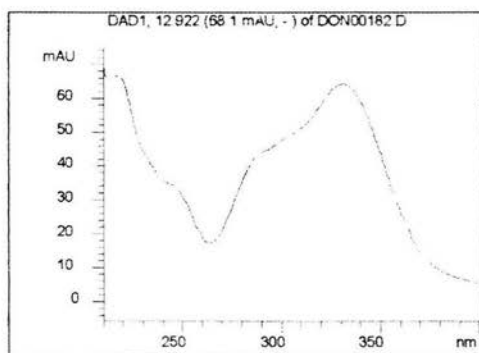


Fig. 15 Espectro UV estándar del verbascósido.

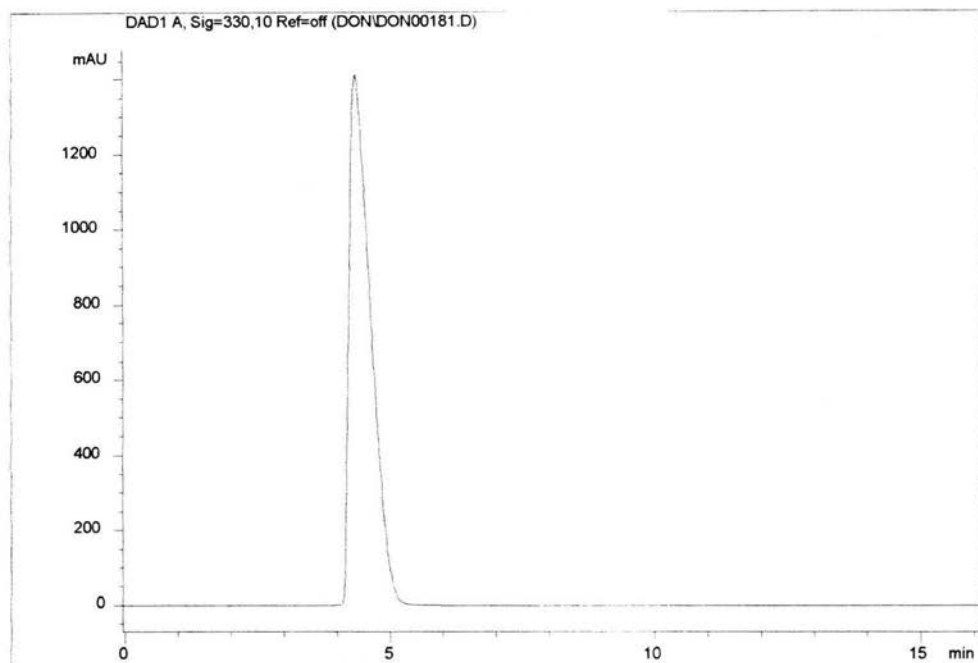


Fig. 16 Cromatograma estándar del ácido cafeico.

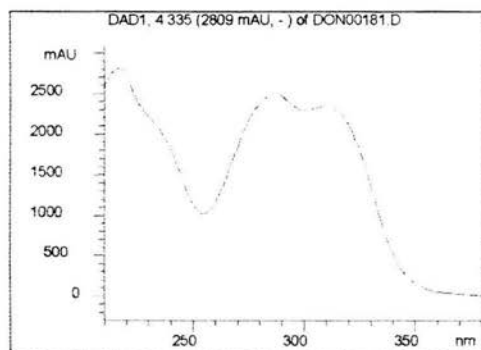


Fig. 17 Espectro UV del ácido cafeico.

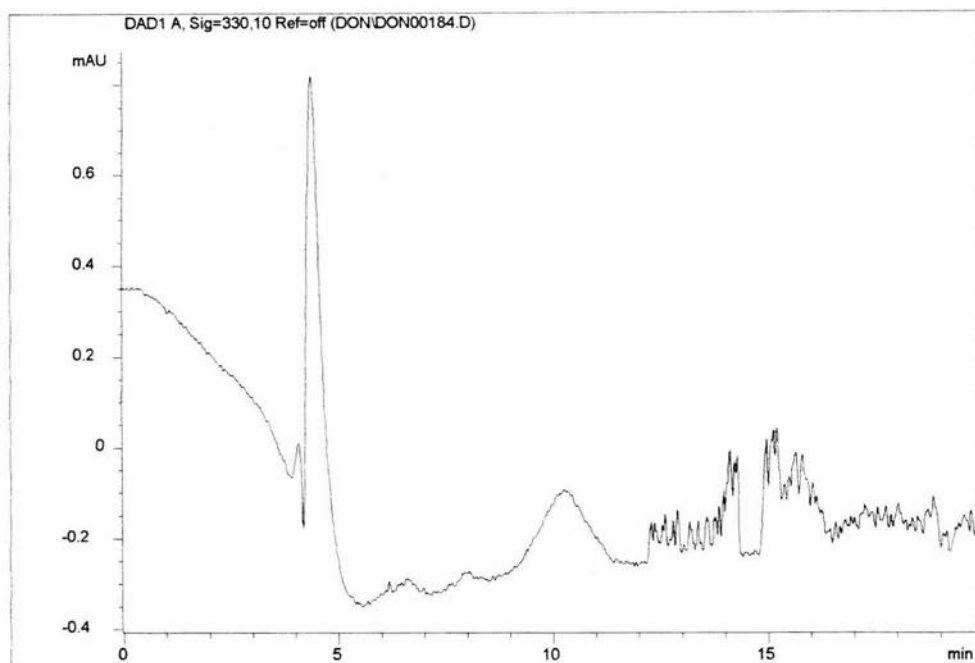


Fig. 18 Cromatograma del testigo (-) etanol 2%.

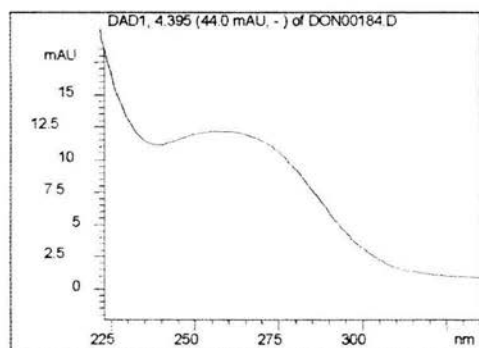


Fig. 19 Espectro UV del testigo (-) etanol 2%.



IZT.

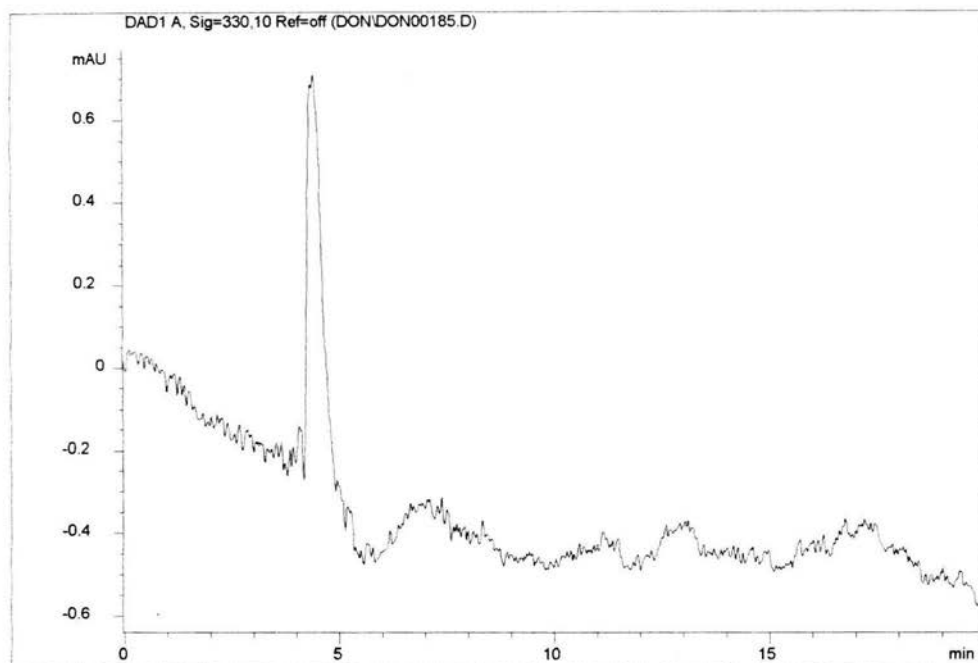


Fig. 20 Cromatograma del verbascósido a 27 mM.

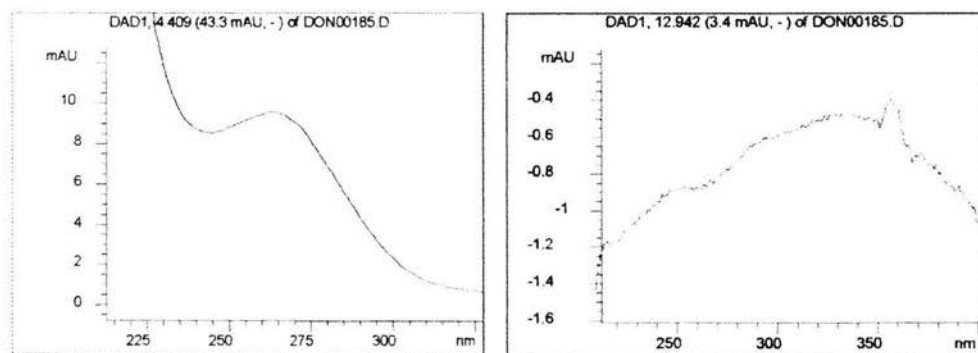


Fig. 21 Espectros UV (a y b) del verbascósido a 27 mM.

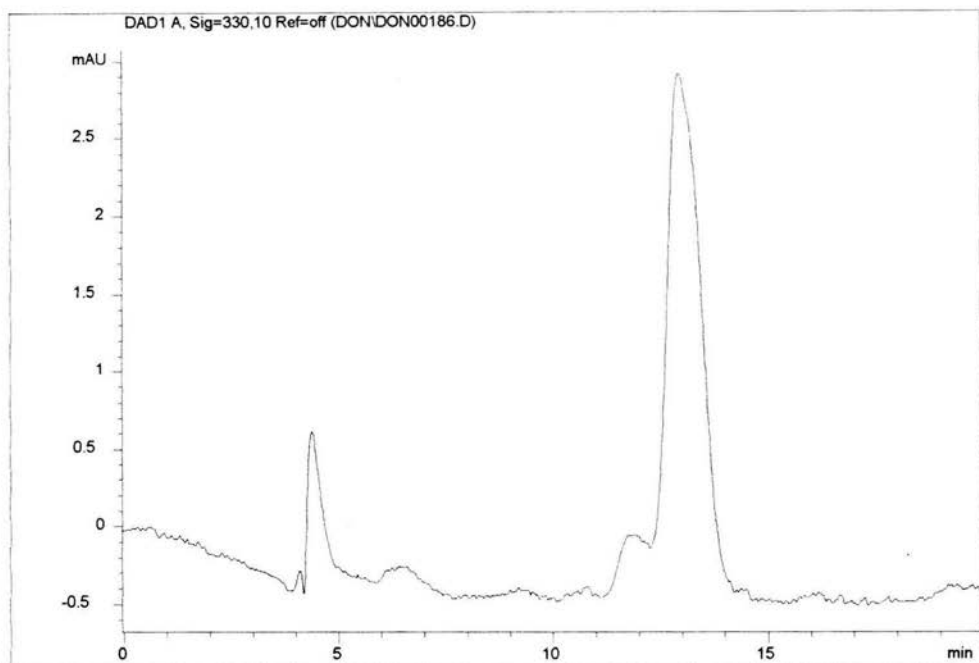


Fig. 22 Cromatograma del verbascósido a 81 mM.

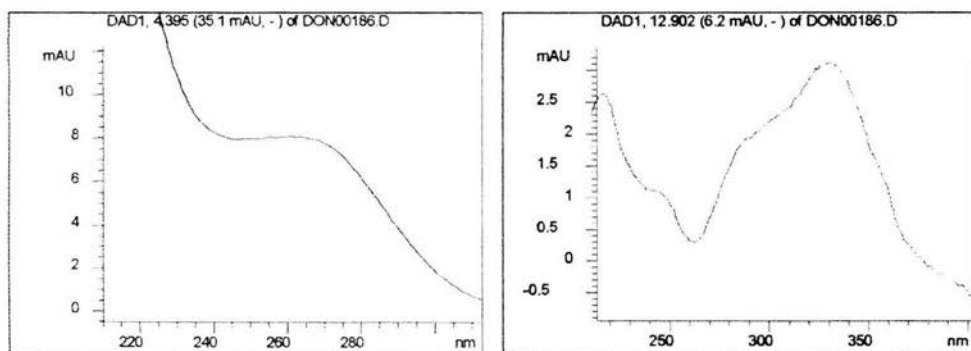


Fig. 23 Espectros UV (a y b) del verbascósido a 81 mM.

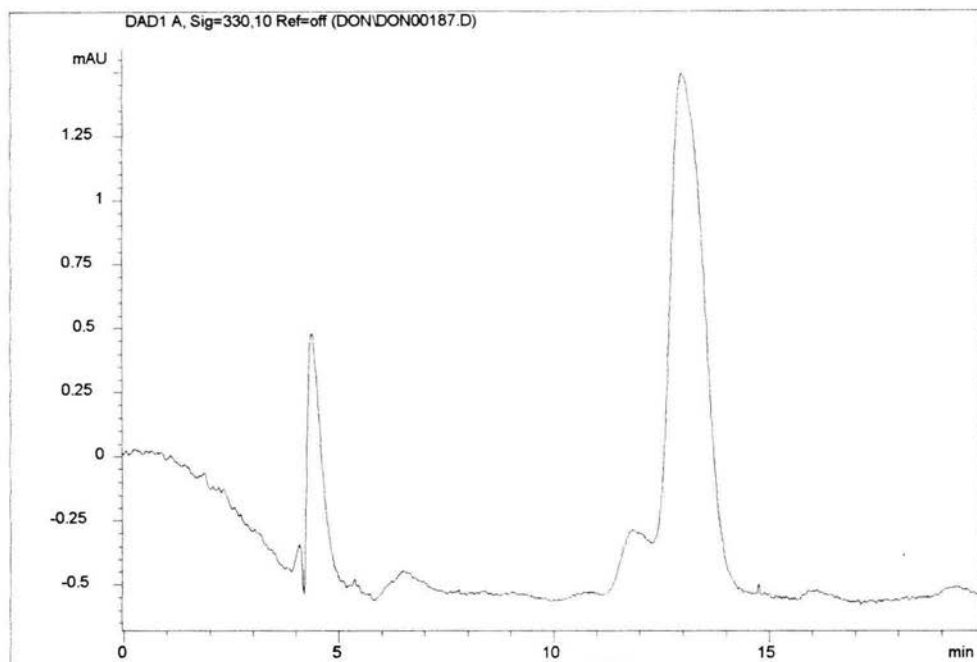


Fig. 24 Cromatograma del verbascósido a 135 mM.

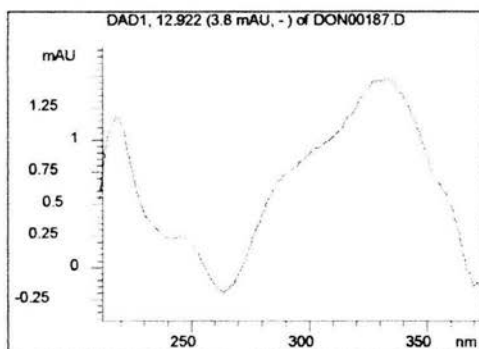
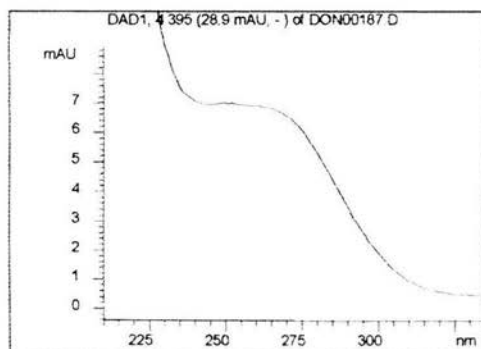


Fig. 25 Espectros UV (a y b) del verbascósido a 135 mM.

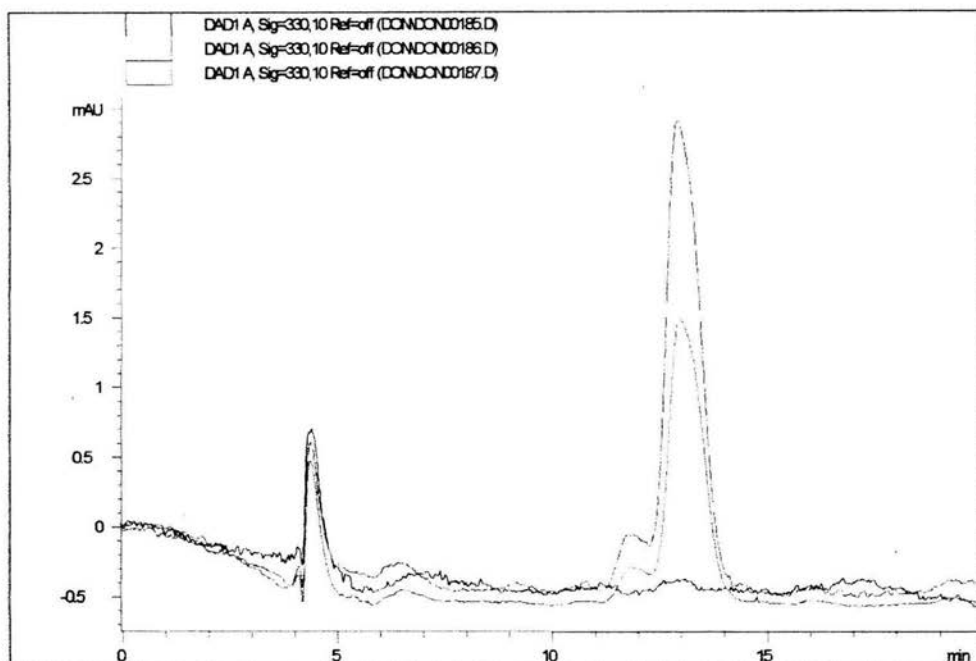
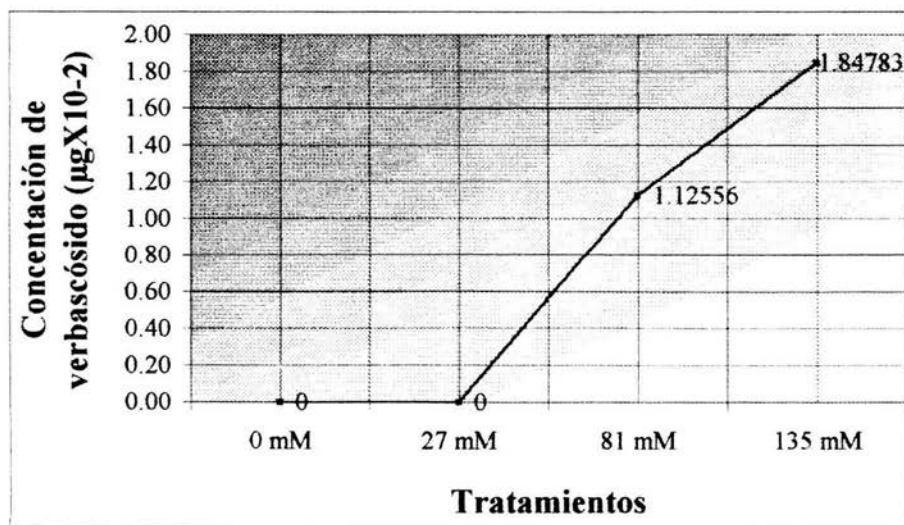


Fig. 26 Cromatograma de 27, 81 y 135 mM de verbascósido.



Gráfica 4. Muestra la correlación positiva entre los tratamientos y la coloración de la parte anteroventral en los organismos dada por los espectros de absorción.

12. Conclusiones.

De *Buddleja scordioides* se aisló el verbascósido con un rendimiento de 3.331%. Se concluye que este rendimiento pudo deberse a que el tiempo de colecta fue en los meses de mayor irradiación solar y mayor rango durante el día.

Se comprobó mediante espectroscopía (UV) y cromatografías en capa fina el aislamiento de un metabolito secundario del tipo fenilpropanoide (verbascósido) con una pureza del 99%.

Se demostró que el verbascósido a 27, 81 y 135 mM no es genotóxico para el bioensayo a corto plazo SMART en ala de *Drosophila melanogaster*, cruza bioactivación elevada.

Se demostró una correlación positiva entre las concentraciones de verbascósido administradas y la intensidad de una coloración oscura en la parte anteroventral del abdomen de *Drosophila melanogaster* por lo tanto se puede utilizar como protector solar.

Los cromatogramas obtenidos por HPLC demostraron en homogenizados de *Drosophila melanogaster*, la presencia de verbascósido el cual fue el responsable de la coloración en la parte anteroventral de *Drosophila melanogaster*.

14. Referencias.

Arciniegas, A., Avendaño, A. Pérez-Castorena, A.L. and Romo de Vivar, A. 1997. Flavonoids from *Buddleja parviflora*. Biochemical Systematics and Ecology. 25: pp. 185-186.

Avila, A.J.G, de Liverant G.J, Martinez, A. Martínez, G. Muñoz, J. L. Arciniegas, A. Romo de Vivar, A. 1999. Mode of actino of *Buddleja cordata* verbascoside against *Staphylococcus aureus* Journal of Ethnopharmacology. 66: pp.75-78

Athar, M., Agarwal, R., Bickers, D., and Mukhatar, H. 1992. Role of reactive oxygen species in skin. In. Pharmacology of the skin. CRC Press Series in Pharmacology and Toxicology. pp. 270-276.

Arenas, R. 1987. Dermatología atlas diagnostico y tratamiento. Editorial McGraw-Hill Ineramericana. México. p.47.

Arroyo, R.G. 1994. Estudio de las propiedades fotoprotectoras-cosméticas del extracto de *Amphipterygium adstringes* (cuachalalate). Tesis de Químico fármaco biólogo. UNAM. FES Cuautitlan. Edo. de México. pp.13-18. 34-35.

Brash, D.E., Rudolph, J.A., Simon, J.A., Lin, A., McKenna, G.J., Baden, H.P., Halper, A.J., and Pontén, J. 1991. A role for sunlight in skin cancer: UV-induced p53 mutations in squamous cell carcinoma. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 88: pp. 10124-10128.

Batiste-Alentron. M, N. Xamena. Creus. A y Marcos. R. 1994. Further Studies with the Somatic White-Ivory System of *Drosophila melanogaster*: Genotoxicity Testing of Then Carcinogens. Environ. Mol. Mut. 24: pp. 143-147.

Beindic, A. 1994. Role of antioxidants in the maintenance of immune function. In: Natural antioxidants in human health and disease. Academic Press Inc. USA.

Bissett, D.L. 1991. Time-dependent decrease in sunscreen protection against chronic photobiol. B: Biol. 9: pp. 323-334.

Bisby, R.H. 1990. Interactions of vitamin E with free radicals and membranes. Free Radic. Res. Commun, 8: pp. 299-306.

Bourre, J.M. 1988. Radicaux libres, acides gras polyinsaturés, mort cellulaire, viellissement cerebral. C.R. Soc. Biol. 185: pp. 5-36.

Buechter, D.D. 1988. Free radicals and oxygen toxicity. Pharm. Res 5 (5): pp.253-260.

Cárdenas de la Peña, E. 1983. Terminología Médica. Ed. Interamericana. 2ª ed. México. pp. 55-57.

Heres, P.M.E., López, D.H., Castañeda, P.L., Dueñas, G.I.E., Cárdenas A.S.L., Cerón M.G. y Tavera B.K. 2002. Determinación de la LD-50 del verbascósido y del ácido cafeico en dos líneas de *Drosophila melanogaster*, OR(R) y *flr*³. (en prensa).

Clavel, J.O., Emerit J., Thuillier A. 1985. Lipidoperoxydation et radicaux libres. Rôle en biologie cellulaire et en pathologie. Path. Biol. 33: pp. 61-69.

Cooper, R., Solomon, P.H., Kub, I., Nakanishi, K., Shooleri, J.N. and Occolowitz, J.C. 1980. Myricoside, an african armyworm antifeedant: separation by droplet countercurrent chromatography. J. Amer. Chem. Soc. 102: pp. 7953-7955.

Cross, E., Hallweil, B., Borish, E., Pryor, W. Ames, B., Saul, R., Mc-Mcord, J., and Harman, D. 1987. Oxygen radicals and human disease clinical Conference. Ann Intern. Med. 107 (4): pp. 525-545.

David, J., Bocquet, C. 1974. Nouvelles particularités génétiques des souches japonaises de *Drosophila melanogaster*. Arch. Zool. exp.gen. 1 (15): pp. 489-503.

Deby C. y Pincemail J. 1986. Toxicité de l'oxygène, radicaux libres et molécules de défense. La Presse Médicale. 15: pp. 1468-1474.

Delgado-Rodríguez A., Ortiz-Marttelo R., Graf U., Villalobos Pietrini R and Gómez -Arroyo S. 1994. Genotoxicity produced by airborne particules in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. Rev. Int. Contamin. Ambient. 10 Suppl. 1: pp. 25-26

Delgado-Rodríguez A., R. Ortiz-Marttelo, U. Graf. R. Villalobos Pietrini y Gómez -Arroyo S. 1995. Genotoxic activity of environmentally important polycyclic aromatic hydrocarbons and their derivatives in the wing spot test of *Drosophila melanogaster* Mut. Res. 341: pp. 235-247.

Demerec, M. 1965. Biology of *Drosophila*. Hafner Publishing Co. USA.633.

Droy-Lefaix M.T. 1989. Radicaux libres et pathologies oculaires. In: Biologie Fondamentale et Clinique de la Retine. Eds. Springer-Verlag, Paris. pp. 75-85.

Epstein, J.H. 1997. Biological effects on sunlight. In: Lowe, N.J., Shaath, N.A. and Pathak, M.A. Eds. Sunscreens. Development, evaluation and regulatory aspects. 2d edition. Marcel Dekker, Inc. New York, USA. pp. 83-100.

Epstein, J.H. 1997. Photocarcinogenesis, skin and aging. In: Balin, A.K. and Kligman, A.M. Eds. Aging and skin. Raven Press. New York, USA. pp. 307-329.

Fernández, G. 1994. La pérdida de ozono en la estratosfera y su repercusión en piel. *Dermatología Rev Mex.* 38: pp. 121-124.

Freeman, S., Hacham, H., Gange, R., Maytum, D., Sutheriand, J., and Sutheriand, B. 1989. Wavelength dependence of pyrimidine dimer formation in DNA of human skin irradiated in situ with ultraviolet light. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 88: pp. 5605-5609.

Frei, H. and Würgler, F.G. 1988. Statistical methods to decide whether mutagenicity test data from *Drosophila melanogaster* indicates a positive, negative or inconclusive result. *Mut. Res.* 203: pp. 297-308.

Friedberg, E.C., Walker, G.C and Siede, W. 1995. DNA repair and mutagenesis. ASM Press, Washington. 698 p.

García Bellido A and Dapena, J. 1974. Induction, detection and characterization of cell differentiation mutants in *Drosophila melanogaster*. *Molecular Genetics* 128: pp. 117-130.

García Bellido, A and Merriam, J. R. 1971. Parameters of the wing imagial disc development of *Drosophila melanogaster*. *Developmental Biology* 24: pp. 61-87.

García, B. A. 1998. Evaluación de un filtro solar de *Yucca filifera*, Tesis de licenciatura, UNAM, ENEP- Iztacala, Edo de México.

Gerschman, R., Gilbert, D., Nye, S., and Ferr, W. 1954. Oxigen poisoning and X radiation a mechanism in common. *Science.* 119: pp. 623-626.

Graf, U., Würgler, F.E., Katz, A.J, Frei, H., Juon, H., Hall, C. B and Kale, P.G. 1984. Somatic Mutation and Recombination Test in *Drosophila melanogaster*. *Environmental Mutagenesis* 6: pp. 153-188.

Graf, U and Würgler, F. E. 1986. Investigation of coffee in *Drosophila melanogaster* genotoxicity tests. *Fd. Chem. Toxic.* 24: pp. 835-842.

Graf, U and Singer, D. 1989. Somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster* (wing spot test): Effects of airborne matter from fireexposed and non fire-exposed building ventilation filters. *Chemosphere* 19: pp. 1094-1907.

Graf, U., Schaik, N. 1992. Improved high bioactivation cross for the wing somatic mutation and recombination tes in *Drosophila melanogaster*. *Rev. Int. Contam. Ambient.* 8: pp. 15-27.

Graf, U., Alonso-Moraga, A., Castro, R and Díaz-Castillo, E. 1994. Genotoxic testing of different types of beverages in the *Drosophila* wing mutation and recombination tes. *Fd. Chem. Toxic.* 32: pp. 423-430.

Graf, U. 1995. Analysis of the relationship between age of larvae at mutagen treatment and frequecy and size of spots in the wing somatic mutation and recombination test of *Drosophila melanogaster*. *Experientia* 51: pp. 168-173.

Graf, U and Würgler, F.E. 1996. The somatic white-ivory eye spot test does not detect the same spectrum of genotoxic events as the wing somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*” *Environ and Mol. Mult.* 27: pp. 219-226.

Guzmán R.J and Graf, U. 1995. *Drosophila melanogaster* somatic mutation and recombination test as a biomonitor. In: *Biomonitor and biomarkers as indicators of environmental change*, Environmental Science Research. 50: pp. 169-181.

Houghton, P.J. 1984. Ethnopharmacology of some *Buddleja* sp. *J. Ethnopharmacol.* 11: pp. 293-308.

Houghton, P.J. 1985. Lignans and neolignans from *Buddleja davidii*. *Phytochemistry.* 24: pp. 819-826.

Houghton, P.J., Woldemariam, T.Z., Candau, M., Barnardo, A., Omedele, K, and Li, S. 1996. Buddlejone, a diterpene from *Buddleja albiflora*. *Phytochem.* 42: pp. 485-488.

Holliwel B. 1989. Free radicals and antioxidant protection mechanisms and significance in toxicology and disease. *Human Taxicol.*, 2988. (7): pp. 7-13.

Hutchinson, J. 1973. *The Families of Flowering Platns*, 3th ed. Oxford University Press. London England. p. 463.

Ibrahim, R. and Barrón, D. 1989. Phenylpropanoids In: *Methods implant biochemistry*. Vol.1. Academic Press Limited. USA.

IMSS (Instituto Mexicano del Seguro Social) 1994. Atlas de plantas medicinales en México.

INI (Instituto Nacional Indigenista). 1994. Flora medicinal indígena de México. Instituto Nacional Indigenista. México 1-3: pp. 155, 261, 1096, 1370.

Kitagawa, F., Sukamoto, H., Hisada, F., and Nishibe, F. 1984. Chem. Pharm. Bull. 32: pp. 1209-1213.

Larson, R., 1988 The antioxidants of higher plants. Phytochemistry. Vol. 27: pp. 969-978.

Leeson, T., Leeson R., and Paparo, A., 1989. Texto/Atlas de histología. Mc Graw Hill México. pp. 363-393.

Lehninger, A., 1981. Principios de Bioquímica. Omega. España.

Linsdley, L., and Zimm, G. 1992 The genome of *Drosophila melanogaster*. Academic Press, Inc., U.K. p. 1142.

López, J., Sierra, J., Vegazo, M.E. and Córtes, M. 1979. Chemical constituents of *Buddleja globosa* Lam. Fitoterapia 50: 195-198.

Lowe, N. 1990. Sunscreens. Marcel Dekkel, Inc. USA.

Maridonneau, I., Broquet, P., Garay, R.P. 1983. Alteration of Na⁺ and K⁺ transport systems by oxy free radicals in human red cell membranes. in: Oxy radicals and their scavenger systems-Cellular and medical aspects. Eds. Greenwald R.A., Cohen B. Vol: II. pp.199-204.

Madhukar, A. 1992. Sunscreens: Principles of photoprotection. In: Pharmacology of the skin. CRC Press Series in Pharmacology and Toxicology. pp. 230-247.

Mitchell I. de G. 1984. Mutation test with the fruit fly *Drosophila melanogaster*, Incluido en: Mutagenicity testing a practical approach, Edited by S. Venitt & J. M. Parry, IRL. Press, U.K. pp. 149-155.

Moore, R. J. 1982. Cosmetología de Harry. Chemical Publishing. 7^a. ed. New York.

Nishibe, F., Okabe, K., Sukamoto, H., Sacoshima, A., Hisada, F., Baba, H. and Akisada, P. 1982. Studies on the chinese crude drug "Forsythiae fructus" VI. The structure and antibacterial activity of suspensaside isolated from *Forsythia suspensa*. Chem. Pharm. Bull. 30: pp. 4548-4553.

Pathak, M.A. 1986. Sunscreens: topical and systemic approaches for the prevention of acute and chronic sun-induced skin reactions. *Dermatol. Clin.* 4: pp. 321-334.

Pathak, M.A. 1995. Sunscreens: Principles of photoprotection. In: *Pharmacology of the skin*. Edited by Mukhtar, H. CRC Press. London, England. pp. 229-248.

Pearce, E. C. 1981. *Manual de Anatomía y Fisiología*. Ed. Eliciém. 2ª ed. España. pp. 309-317.

Pryor, W. 1994. Oxidants and antioxidants. Free radicals and lipid peroxidation: What they are and how they got that way. In: *Natural antioxidants in human health disease*. Academic Press Inc. USA. pp. 1-62.

Ramos, P. A., Gaytan, H. M., Ordaz, M. G., Orozco, P. A., Maldonado, J., Hernández, J., Gonzalez, E., Reyes, P., Galicia, E. M., Muñoz, J. A., 1993. *Manual de laboratorio de genética para Drosophila melanogaster*. Editorial McGraw-Hill. México. p. 131.

Rusell, O., 1992. Structure of the skin. In: *Pharmacology of the skin*. CRC Press Series in Pharmacology and Toxicology. pp. 14-25

Rzedowski, J. y Rzedowski, G. 1985. *Flora Fanerogámica del Valle de México*, Vol. II: Dicotyledoneae. Ed. E.N.C.B. México, D.F. pp. 212-215.

Stanley, W. J. 1982. *Anatomía y Fisiología Humana*. Ed. Interamericana. 4ª ed. México. pp. 78-86.

Yamamoto, A., Miyase, T., Ueno, A. and Maeda, T. 1991. *Buddleja* saponins I-IV, four new oleanane-triterpene saponins from the aerial parts of *Buddleja japonica* Hemsl. *Chem. Pharm. Bull.* 39: pp. 2764-2766.

Yamamoto, A., Nitta, S., Miyase, T., Ueno, A. and Wu, L. 1993. Phenylethanoid and lignan- iridoid complex glucosides from roots of *Buddleja davidii*. *Phytochem.* 32: pp. 421-425.

Yoshida, T., Nobuhara, J., Uchida, M. and Okuda, T. 1978. I-Studies on the constituents of *Buddleja* species. Y structures of buddledin a and b, two new toxic sesquiterpenes from *Buddleja davidii* Franch. *Chem. Phamacol. Bull.* 26: pp. 2535-2542.

Van Schaik N., A. Grant J. Rubenchik y U. Graf. 1984. Use of *Drosophila* test systems for genotoxicity testing of herbal teas. *Immunol. Hematol. Res.* 3: pp. 199-202.

Falta página

Nº 51

12 Anexo.

Anexo 1. Propagación de la línea *mwh* de *Drosophila melanogaster*.

Para la propagación de la línea es necesario:

1). Examinar cuidadosamente con un microscopio estereoscópico cada mosca de la línea de interés (*mwh*) cada vez que se propague la línea, para detectar cualquier contaminación por moscas de otras líneas y prevenir la pérdida de los marcadores, que para el caso de la línea *mwh* es el número de tricomas por célula que va de 3 a 5.

2). Para sembrar nuevos cultivos se colocaron aproximadamente de 20 a 30 parejas de moscas por frasco de la línea *mwh*, con medio (5 grs de puré de papa deshidratado con 20 ml de solución A) para evitar el crecimiento de hongos y bacterias, por un tiempo 48 horas, retirando de los frascos a los progenitores para evitar que se fecunden con la descendencia.

3). Cada frasco se etiquetó indicando la línea y la fecha de la siembra.

4). Las moscas se transfirieron a medio fresco cada 3 días y los cultivos se mantuvieron a temperatura ambiente y se mantuvieron un mínimo de 6 frascos de la línea *mwh*.

Anexo 2. Reconocimiento fenotípico del sexo.

En la mayoría de los estudios de investigación se involucra la manipulación de los organismos resultando indispensable reconocer el sexo de cada uno de ellos. Recurriendo al empleo de características sexuales distintivas de cada uno de ellos; en ocasiones este trabajo se facilita por la presencia de dimorfismo sexual.

En *Drosophila melanogaster* el tamaño de la hembra es mayor al del macho. Los organismos adultos miden de 2-3 mm de longitud.

El abdomen de los machos tiene en su extremo terminal tres segmentos fusionados los cuales están melanizados; por su parte el abdomen de las hembras no tiene fusionados estos segmentos y la coloración de estos es uniforme; en la hembra la terminación del abdomen es ligeramente puntiaguda en contraste con la del macho, que es más redondeada.

La placa genital de la hembra se caracteriza por tener un ovopositor, mientras que la del macho esta formada por múltiples piezas, generalmente de coloración oscura.

Estas características son, por lo general, suficientes para el sexado y fáciles de observar con un microscopio estereoscópico. Sin embargo, en las moscas que recién han emergido, la coloración típica aún no se presenta; además, algunos marcadores asociados con el color del cuerpo pueden modificar estos patrones de pigmentación, por lo que los machos apenas pueden exhibir pigmento y las hembras apenas mostrar un exceso de este, haciendo confusa la distinción de sexos por este método (Ramos *et al*, 1993).

Las moscas separadas por sexo fueron colocadas en tubos de ensayo de 110 mm x 15 mm con 0.5 grs de medio y 2 ml de solución A.

Anexo.3 Identificación de hembras con mayor índice de fecundidad.

La selección de las parejas con mayor índice de fecundidad se logró así:

1. Después de emerger de las pupas se realizó un sexado de los organismos provenientes de los cultivos *mwh*.

2. Colocándolas en parejas (una por tubo, siendo utilizados alrededor de 20 tubos), con medio fresco y dejándolas por un periodo de 2 días.

3. Posteriormente se retiraron a los adultos de la línea *mwh*, colocándolos en frascos con medio fresco y debidamente etiquetados, anotando el número de tubo del cual fueron separados para evitar confusiones a la hora de contar la descendencia.

4. Se esperaron 12 días contando desde que se colocaron las parejas de la línea *mwh*, hasta que emergieron todos los organismos, después del cual se realizó el conteo de los organismos vivos de todos los tubos.

5. Tomando en cuenta que el número más alto de sobre vivencia nos indicaba el mayor índice de fecundidad, separando los frascos por dicha característica, asegurando con esto tener un número mayor de organismos para aislar a las hembras vírgenes y posteriormente realizar la cruce para llevar a cabo la experimentación necesaria.

Anexo.4 Adquisición de habilidades para la colecta de huevos.

Se ha practicado la preparación del medio que contiene levadura activada:

1. En un recipiente se agregaron 50 ml de agua destilada, 125 g de *Saccharomyces cerviceae* (levadura para hornear pasteles) y de 3 a 5 g de sacarosa, los cuales se mezclaron hasta dar una mezcla homogénea.

2. La mezcla se colocó en baño maría a 40° C durante 5 minutos, para activar a las levaduras, repitiendo este paso por lo menos tres veces y asegurando así que el medio tenga una consistencia suave y permita con esto que las larvas se puedan desplazar y alimentar con facilidad.

3. El medio de levadura se depositó en frascos de 250 ml, a los cuales se les colocó una malla fina para evitar que se contamine con otras líneas o *Drosophilas silvestres*.

4. Se colocaron a varias hembras y machos de la línea *mwh* o la línea OR(R) por un periodo de 8 horas para permitir ovopositar a las hembras, después de lo cual los adultos fueron retirados.

5. Los frascos con levadura que contienen los huevos fueron colocados en la incubadora a 25° C por 72 horas.

6. Posterior a esto se realizó la obtención de larvas realizando un tamizado con malla fina (500 μ aprox.) y agua corriente a temperatura ambiente para disolver el medio y capturar a las larvas.

13 Solventes utilizados para la extracción del verbascósido.

Producto: Hexano.

Formula: C_6H_{14}

Material: Flamable y Carcinógeno.

Lote no. 990611 t36.

No. CAS. 52761.

Comercial Química Sandan, S.A. de C.V. Productos Químicos para la Industria.

Certificado de análisis.

Característica	Especificación	Resultado	Método
Apariencia	Líquido transparente		Visual
gravedad específica (15/15° C)	0.662-0.667	0.663	ASTM D-1298
Rango de destilación (° C) a 585 mm/hg	55-63	55-62	ASTM D-1078
Color pt/co	5max	5	ASTM D-1209
Identidad cromatográfica	Similar a std	Similar a std	GAC/08-001
Olor	Característico	Característico	

Los datos antes mencionados son copia fiel de los proporcionados por nuestro proveedor.

Producto: Alcohol Etilico.

Formula: $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$.

Material: Flamable.

Lote no. 0204-2001.

No. CAS. 24102.

Comercial Química Sandan, S.A. de C.V. Productos Químicos para la Industria.

Certificado de análisis.

Densidad a 15° C		0.813
Grado alcohólico real a 15° C		96.3
Color		Característico
Olor		Característico
Apariencia		Característico
Solubilidad	Agua	Cumple
	Cloroformo	Cumple
	Éter	Cumple
Identidad	Olor a Yodoformo	Cumple
Acidez	0.88ml de naoh 0.02 n	Cumple
Residuo no volátil	0.02 mg	Cumple
Sustancias insolubles en el agua		Cumple
Aldehidos e impurezas orgánicas	Permanecen color rosa	Cumple
Alcohol amilico	Sin coloración alguna	Cumple
Aceites de cereales	Sin olor extraño	Cumple
Acetona y alcohol isopropilico	No se forma precipitado	Cumple
Metanol	No aparece coloración violeta	Cumple

Los datos antes mencionados son copia fiel de los proporcionados por nuestro proveedor.

Producto: Metanol.

Formula: CH₃OH.

Material: Flamable y Venenoso.

Lote no. VME0802-02.

No. CAS. 34899.

Comercial Química Sandan, S.A. de C.V. Productos Químicos para la Industria.

Certificado de análisis.

Análisis	Especificación	resultado	Método
Rango de destilación a 585 mmhg			
Temperatura inicial de ebullición	57°C	57°C	ASTM-D-1078
Temperatura final de ebullición	65°C	60°C	ASTM-D-1078
Peso específico a 20/20°C	0.789 a 0.794	0.790	ASTM-D-268
Humedad	0.1% máximo	0.07%	Cromatografía
Índice de refracción	1.3240 a 1.3340	1.3285	Refractómetro
Apariencia	l.c.l.i	l.c.l.i	ASTM-D-4670
Color pt/co	10 máximo	3.0	ASTM-D-1209
Solubilidad en agua	soluble	completa	ASTM-D-4670
Pureza por cromatología de gases	99.5 mínimo	99.50%	Cromatografía

Los datos antes mencionados son copia fiel de los proporcionados por nuestro proveedor.

Producto: Diclorometano.

Formula: CH₂Cl₂

Material: Flamable y Carcinógeno.

No. del producto: D6,510-0.

No. CAS. 66742.

Marca: SIGMA.

Color	≤ 10
Residuo	
Evaporizacion	≤ 0.002 %
Halogenos libres	
Agua	≤ 0.02 %
Apariencia	Limpia

Producto: Celita.

Material: Para cromatografia.

No del producto: C 8656.

No. CAS. 22151.

Marca: SIGMA.