



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

“Determinación del efecto genotóxico de Malmea depressa mediante el empleo de células somáticas del ala de Drosophila melanogaster”.

T E S I S  
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I O L O G A

P R E S E N T A :

RUTH RUIZ ESPARZA GARRIDO



DIRECTORA DE TESIS: DRA. AMÉRICA NITXIN CASTAÑEDA SORTIBRÁN

2006



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.

## **DEDICATORIAS:**

A mi Padre celestial por el infinito amor y cuidado que ha tenido conmigo, por estar siempre delante de mi y haber permitido concluir esta meta. Gracias por llevarme de la mano día a día por que sin Ti no lo hubiera logrado.

A mis padres:

Mamá: gracias por haberme dado la vida, por amarme y cuidarme siempre, por estar a mi lado y guiarme, por tu apoyo incondicional y tu gran ejemplo de lucha y perseverancia para sacarnos adelante

Papá: por haberme regalado lo más grande de esta vida y encontrar así a ese Dios que me ama tanto. Por ese amor incondicional que siempre has tenido conmigo, sabes que te admiro y amo muchísimo.

A Miguel y Yolanda por haberme abierto las puertas de sus vidas con tanto amor y cariño, por cada consejo y cada palabra de aliento que siempre tienen para mi, por ser dos personas realmente especiales en mi corazón.

A mis hermanos:

Raúl y Bety, por esa infancia tan maravillosa que viví a tu lado, por cada momento que compartimos y que jamás olvidaré y sé que tu tampoco lo harás. Nunca olvides que eres muy importante para mí, que desde que llegué a este mundo te admiré, amé y siempre será así. Te extraño y quiero más de lo que puedes imaginar.

Areli (Sir): siempre ten presente que te amo y que eres una parte fundamental de mi vida. Recuerda que siempre estaré para ti cuando me necesites y que nadie en esta vida podrá amarte y cuidarte más que tus hermanos.

Sari: Por todas las aventuras que hemos pasado juntas, por lo que hemos aprendido de la vida y por que eres parte de mi corazón. Te quiero muchísimo.

Abdiel: Por tu ejemplo de lucha y constancia, por que has salido adelante en cada una de las situaciones que has vivido. Te quiero.

A mis compañeros del laboratorio, Varenca, Judith, Horacio, Memo y Guillermo por todos los momentos que pasamos, por su amistad y cariño

A mis tíos: Josué y Elizabeth, los quiero con todo mi corazón.

A Miguel Ángel Velásquez Flores, mi “zoqueton”, no tengo palabras para agradecerte tantas cosas que has hecho por mí, por tu amor, cariño y respeto. Por llegar como torbellino a mi vida, dándome vida, y enseñándome a disfrutar la vida de una forma que jamás imagine. Te amo con todo mi corazón y alma ahora y siempre.

## **AGRADECIMIENTOS.**

A la Dra. América Nitxin Castañeda Sortibrán por dirigir este proyecto de licenciatura. Gracias por la amistad y cariño que me brindaste a lo largo de este tiempo. Por tu paciencia y esfuerzo mil gracias.

A la Dra. Rosario Rodríguez Arnaiz por todos los conocimientos que adquirí a través de usted, por la enorme paciencia que tiene con nosotros.

A la M. en C. Irma Helena Dueñas García, no tengo palabras para agradecerte el apoyo que me diste, por tu gran interés hacia este trabajo, por las horas que invertiste revisando y sobretodo por la alegría que contagias a todo el que te rodea.

Al Dr. Adolfo Andrade Cetto. Por todo el apoyo a mi proyecto de tesis.

Al Biól. Horacio, por todo el empeño que pusiste en mi trabajo para que quedara bien.

Al Profesor Ángel Durán de la FES Iztacala por su apoyo en la realización de este trabajo.

A la M. en C. Guadalupe Ordaz Téllez por compartir su conocimientos y su amistad con migo.

## Hoja de Datos del Jurado

### Datos del alumno.

Ruiz Esparza

Garrido

Ruth

56-59-08-83

Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Ciencias

Biología

### Datos del Tutor.

Dra.

América Nitxin

Castañeda

Sortibrán

### Datos del sinodal 1

Dra.

Rosario

Rodríguez

Arnaiz

### Datos sinodal 2

M. en C.

Irma Helena

Dueñas

García

### Datos sinodal 3

Dr.

Adolfo

Andrade

Cetto

### Datos sinodal 4

Biólogo

Horacio Valdemar

Barcenas

Rodríguez

### Datos trabajo escrito.

“Determinación del efecto genotóxico de Malmea depressa mediante el empleo de células somáticas del ala de Drosophila melanogaster”.

Numero de paginas: 55  
2006

## ÍNDICE.

1. Resumen.....	3
2. Introducción.....	4
2.1 Historia de las plantas medicinales.....	4
2.2 Antecedentes <i>Malmea depressa</i> .....	8
2.3 Taxonomía.....	9
2.4 Usos medicinales de <i>Malmea depressa</i> .....	10
2.5 Antecedentes fitoquímicos.....	10
2.6 Antecedentes farmacológicos.....	12
3. Citocromos.....	12
4. Metabolismo.....	14
5. Diabetes.....	16
5.1 Tipos de diabetes.....	17
6.1 Toxicología.....	19
6.2 Toxicología Genética.....	20
7. <i>Drosophila melanogaster</i> .....	21
7.1 Biología del Desarrollo de <i>Drosophila melanogaster</i> .....	23
7.2 Prueba de mutación y recombinación somática (SMART).....	25
8. Justificación.....	27
9. Objetivo General.....	28
9.1 Objetivo Particular.....	28
10. Hipótesis.....	29
11. Métodos.....	30
11.1 Cepas.....	30
11.2 Sistema de Cruza.....	30
11.3 Prueba de Toxicidad.....	32

11.4 Procedencia del Extracto.....	32
11.5 Medio de Cultivo.....	32
11.6 Ensayo SMART.....	33
12. Análisis Estadístico.....	35
13. Resultados.....	37
13.1 Toxicidad.....	37
13.2 Genotoxicidad.....	38
13.3 Cruza Estándar (ST).....	38
13.4 Cruza de Alta Bioactivación (BH).....	41
14. Discusión.....	43
15. Conclusión.....	48
16. Bibliografía.....	49



## 1. Resumen

El ensayo de mutación y recombinación somáticas (SMART) ha mostrado ser muy eficiente en la evaluación de diversos compuestos químicos, con estructura diversa, capaces de inducir recombinación mitótica y mutaciones puntuales en la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster*. El ensayo se realizó con cepas que contienen niveles basales de las enzimas que biotransforman compuestos xenobióticos (cruza estándar) y con cepas en las cuales se manifiesta una sobreexpresión constitutiva de estas enzimas denominadas de alta bioactivación (cruza de bioactivación elevada). *Malmea depressa* es una planta que se distribuye principalmente en el sur de México y Centroamérica y es empleada en la medicina tradicional para el tratamiento de diversos padecimientos, entre los que destaca la diabetes mellitus tipo II.

Es importante mencionar que fueron encontrados dos compuestos principales en los extractos de la raíz de *M. depressa*, los cuales son derivados del fenilbutano.

Se realizó una prueba de toxicidad del extracto, en larvas de  $72 \pm 3$  hrs. y en moscas adultas, demostrando que la toxicidad del extracto es nula para las concentraciones probadas.

El objetivo del presente trabajo fue el de evaluar la actividad genotóxica del extracto fitoterapéutico de *M. depressa* mediante el ensayo SMART.

El extracto se administró en forma aguda (6hrs) a larvas de  $72 \pm 3$  hrs., se probaron 5 concentraciones y los testigos concurrentes se trataron con el solvente (agua). Se realizaron dos experimentos con sus repeticiones respectivas. Los adultos se fijaron en etanol al 70%. Se disectaron las alas y se colocaron en portaobjetos para ser analizadas en el microscopio óptico a 40x. Los datos obtenidos se analizaron mediante el programa estadístico SMART para PC- versión 2.1, con un nivel de significancia de  $P < 0.05$ .

Los resultados mostraron que no hay diferencias estadísticamente significativas en la frecuencia de manchas entre el testigo concurrente y las series tratadas en ambas cruza, lo que indica que no existe efecto genotóxico por parte del extracto.

*“Después dijo Dios: Produzca la tierra hierba verde, hierba que dé semilla; árbol que dé fruto según su género, que su semilla esté en él, sobre la tierra. Y fue así.*

*Produjo, pues, la tierra hierba verde, hierba que da semilla según su naturaleza, y árbol que da fruto, cuya semilla está en él, según su género. Y vio Dios que era bueno.”*

*Génesis 1: 11-12.*

## **2.-Introducción.**

### **2.1 Historia de las plantas medicinales.**

Nadie sabe con exactitud donde y cuando se utilizaron las plantas medicinales por primera vez, lo que es un hecho es que el hombre ha utilizado las plantas como alternativa para el tratamiento de diferentes enfermedades desde tiempos muy remotos, la experiencia de muchos siglos ha mostrado el valor curativo de varias de ellas, logrando así formar las bases de un sistema sofisticado de medicina tradicional. Es evidente que la búsqueda de algún remedio fue algo que se dio en todas las culturas, fruto del deseo del hombre por curar sus enfermedades (Ebadi, 2000). La mayoría de las veces, los descubrimientos fueron el resultado de la búsqueda de nuevos alimentos, lo cual llevó al hombre a experimentar con su propio cuerpo, descubriendo que muchas de las plantas eran comestibles, otras venenosas y que otras producían diversos efectos en su organismo (Heinrich *et al.*, 1998). Se sabe que el primer texto escrito sobre el uso de plantas medicinales tiene cerca de 4000 años de antigüedad y aparece en una tablilla de arcilla perteneciente a la

cultura Sumeria, un antiguo pueblo que habitó al sur de los ríos Éufrates y Tigris (Ebadi, 2000).

Por otro lado, los egipcios utilizaron los principios activos de las plantas medicinales de una forma sistemática, demostrando así, su profundo conocimiento médico a través de escritos como el papiro de Ebers (1700 A.C.), en el cual se encuentran registradas cerca de 700 fórmulas en las que se aplican las propiedades curativas de diversas plantas (Ebadi, 2000). Además, en Asia se sabe que la utilización de plantas se remonta al año 5000 A.C., principalmente en China, donde encontramos registros como el Pen´Tsao, el cual recopila las propiedades curativas de aproximadamente 300 plantas, que eran utilizadas por los habitantes de esta región y que en muchos casos siguen siendo utilizadas hasta nuestros días por la medicina moderna (Kong *et al.*, 2003). En la India, el uso de plantas medicinales nos ha dejado referencias escritas (800 A.C) como el Caraca, el Susruta y el Vagabhta, donde se describen unas 800 especies de plantas (Gómez-Pompa, 1993).

En México, el período prehispánico destaca por el enorme conocimiento que poseían las diferentes culturas en cuanto a plantas medicinales se refiere, el cual quedó grabado en estelas y códices que a su vez fue transmitido de generación en generación (Gómez-Pompa, 1993).

Durante la conquista de América, hubo una lamentable pérdida de conocimientos debido a la destrucción de muchas estelas y códices por parte de los colonizadores. Por lo que sacerdotes y frailes que se trasladaron al “Nuevo mundo”, se dieron a la tarea de recopilar el conocimiento de cada región, enriqueciendo así, sus conocimientos médicos gracias al contacto con

curanderos indígenas, quienes les transmitieron su saber respecto a la utilización de las plantas medicinales americanas (Aguilar y Xolapa, 2002).

El primer relato científico publicado sobre las plantas medicinales americanas se lo debemos al médico sevillano Nicolás Monardes, quién en 1569 escribió el primer tratado de las plantas medicinales de la Nueva España. Una obra aún más notable sobre las plantas medicinales americanas se la debemos a dos mexicanos: el médico indígena Martín de la Cruz y el traductor Juan Badiano; esta obra es conocida como el "Códice Badiano" (Gómez-Pompa, 1993).

El fraile franciscano Bernardino Sahagún produjo una de las más grandes obras etnográficas de México en el inicio de la Colonia. En este trabajo encontramos evidencias del avance de la ciencia agrícola y botánica que poseían las culturas indígenas (Gómez-Pompa, 1993).

México destaca por su enorme diversidad biológica. Nuestro país posee alrededor de 30,000 especies de plantas, de las cuales el Instituto Nacional Indigenista (1997) documentó que alrededor de 3,000 especies son utilizadas por la medicina tradicional, esto es el 10% de la riqueza florística del territorio ([www.cdi.gob.mx](http://www.cdi.gob.mx)).

El conocimiento empírico local es la raíz de la medicina moderna. Por esta razón, hoy en día la Organización Mundial de la Salud (WHO) estima que cerca del 80% de la población mundial depende de los derivados de plantas, ya que son un recurso directo de agentes terapéuticos que forman parte fundamental tanto de la medicina moderna como de la tradicional (Kufer *et al.*, 2005). El interés por las plantas medicinales ha resurgido una vez más en el ámbito de la ciencia y la economía, ya que es frecuente encontrar en la literatura científica la inclusión de especies vegetales como uno de los recursos

más importantes a considerar en la búsqueda de nuevos medicamentos. En este nuevo auge por las plantas medicinales como principal fuente de agentes terapéuticos, los países del primer mundo invierten grandes cantidades de dinero en la investigación farmacológica de plantas medicinales ya que sólo un pequeño porcentaje de los medicamentos que se incorporan al mercado para ser utilizados en la medicina occidental, están constituidos por moléculas nuevas. Asimismo la probabilidad de encontrar nuevas moléculas en las especies vegetales utilizadas por la medicina tradicional es notablemente alta, así como su posibilidad de expresar diferentes mecanismos de acción, ofreciendo una nueva estrategia terapéutica. Siendo este el principal justificante para el desarrollo de nuevos medicamentos a partir de plantas medicinales (Akerlele, 1993). Por ejemplo, en los últimos años, el uso de plantas medicinales en el tratamiento de enfermedades tales como el cáncer y la diabetes crea un panorama muy prometedor puesto que las plantas son una alternativa viable y real en el desarrollo de nuevas técnicas terapéuticas, es decir, obtener nuevas moléculas bioactivas que posean diferentes mecanismos de acción y que puedan llegar a ser la cura a este tipo de enfermedades (Kufer *et al.*, 2005).

La investigación en torno a las plantas medicinales requiere de la ayuda de diversas disciplinas y es un proceso que no puede ser desarrollado por un solo grupo, es por esto que se requiere de la intervención de disciplinas tales como la etnobotánica, la etnomedicina, la farmacología, la fitoquímica, la toxicología, la investigación clínica y la biotecnología para poder desarrollar un nuevo medicamento a partir de plantas. Sin embargo, la validación científica tanto de

las propiedades como de la eficiencia y la composición química de las plantas es muy limitada (Idaomar *et al.*, 2001).

## **2.2 Antecedentes de *Malmea depressa*.**

Hoy en día se cuenta con una gran cantidad de estudios relacionados con plantas medicinales para el tratamiento de diabetes, alrededor de 306 especies de plantas han sido reportadas como hipoglucemiantes en nuestro país (Andrade y Heinrich, 2004) y de éstas, se han aislado una gran variedad de compuestos, entre los que se encuentran: alcaloides, terpenos, flavonoides, etc. Andrade *et al* (2000) y Andrade y Wiedenfeld (2001) por ejemplo, reportan que tanto *Equisetum myriochaetum* como *Cecropia obtusifolia* presentan un efecto hipoglucemiante.

Es importante mencionar que de estas plantas ya habían sido identificados compuestos como glucoflavonoides y ácido clorogénico (Andrade y Wiedenfeld (2001) y Argueta, 1994).

En el caso particular de *Malmea depressa*, tanto la raíz como la corteza, han sido reportadas por la medicina tradicional para el tratamiento de la diabetes mellitus II. Es un árbol de más de 10 metros de altura que se encuentra en América Central y el sur de México, desde Veracruz hasta la Península de Yucatán (Figura 1), siendo una especie dominante en los bosques tropicales. Es conocida comúnmente por la población maya como “elemuy”, “sufricaya”, “elemuy box” y “nazareno prieto” (Andrade y Wiedenfeld, 2001). (Figura 2).



Fig. 1. Distribución de *Malmea depressa*. Este árbol se encuentra distribuido en América Central y México .Modificado de Missouri Botanical Garden ([www.mobot.com](http://www.mobot.com)).

### 2.3 Taxonomía.

*Malmea depressa* es miembro de la familia Annonace, la cual se caracteriza por poseer árboles y arbustos siempre verdes con hojas alternas, sin espículas. Sin embargo Lars W. (1997) propone que el nombre de *M. depressa* debe cambiar a *Mosanona depressa*, esto debido a ciertas características que el autor uso para su clasificación. Presenta además una distribución pantropical que comprende cerca de 120 géneros y alrededor de 2,000 especies (Figura 2) ([www.conabio.gob.mx](http://www.conabio.gob.mx)).




Reino:	Plantae	
Subdivisión:	Angiospermae	
Clase:	Dicotyledoneae	
Familia:	Annonaceae	
Género:	<i>Malmea</i>	
Especie:	<i>Malmea depressa</i>	
Sinonimia:	<i>Guatteria depressa</i> (Baill) Saff. 1922, <i>Mosannonna depressa</i> (Baill) Chatrou, 1998.	

Fig.2 Taxonomía y morfología *Malmea depressa*. (www.mobot.com).

#### **2.4 Usos Medicinales de *Malmea depressa*.**

La raíz de este árbol es utilizada por la medicina tradicional, por las comunidades Mayas del sureste mexicano, para tratar diversos padecimientos: mal de riñón (nefropatías), cálculos renales, leucorrea, gonorrea, destacando entre ellos la diabetes mellitus tipo II, en cuyo caso también se utilizan las hojas, ya que tienen el mismo efecto hipoglucemiante que la raíz. El modo de empleo es mediante infusiones hervidas calientes o dejando reposar las hojas en agua durante unas horas (Andrade y Heinrich, 2005).

#### **2.5 Antecedentes Fitoquímicos.**

Estudios fitoquímicos de la corteza de *M. depressa* han revelado la presencia de compuestos fenólicos (alfa-azarona) y otros tres propenilbencenos; además, de dos alcaloides parecidos, en cuanto a estructura, al alcaloide ateroespermidina. Se ha comprobado que a dosis de 80 mg/kg de alfa-azarona,

se produce un decremento de colesterol y de triglicéridos (Jiménez y Mata, 1996, Aguilar, 1994).

Por medio de un análisis con cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), se confirmó la presencia de 2 compuestos elementales en el extracto de la raíz de *Malmea depressa*, siendo identificados, por medio de espectroscopía, como derivados del fenilbutano:

\* 2-Hidroxi-3,4,5-trimetoxi-1-(2', 4'-hidroxi-3'-dihidroxi) butil-benceno.

\* 2-Hidroxi-3,4,5-trimrtoxi-1 (2',3',4'-hidroxi)butil-benceno (Fig.3) (Andrade *et al.*, 2005).

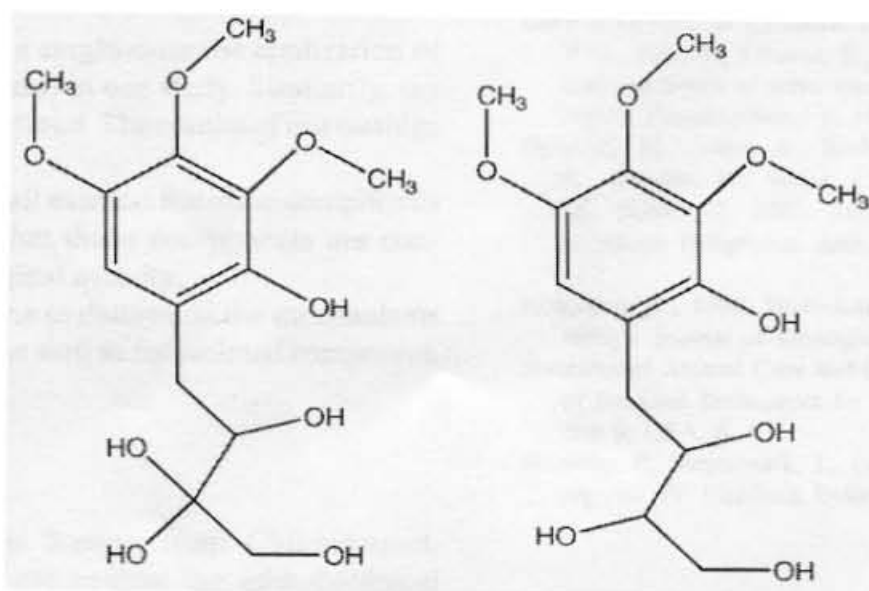


Fig.3 Estructura de los compuestos derivados del fenilbutano, aislados mediante un análisis con HPLC del extracto acuoso de *Malmea depressa*. (Andrade *et al.*, 2005).

## **2.6 Antecedentes farmacológicos.**

Andrade y sus colaboradores (2005) evaluaron la actividad hipoglucemiante del extracto de la raíz de *M. depressa*, utilizando tanto ratas diabéticas, las cuales fueron inducidas por medio de estreptozotocina, como ratas no diabéticas(o en condiciones normales). A ambos grupos se les administró una cantidad de 40mg de extracto de *Malmea depressa* por kilogramo de peso, en un tratamiento crónico, midiendo los niveles de glucosa en sangre (Andrade *et al.*, 2005).

### 3. CITOCROMOS P450.

Los citocromos P450 son una familia de hemoproteínas localizadas en las membranas del retículo endoplásmico de los hepatocitos y de otras células corporales. Como hemoproteína consiste de una parte proteica (apoproteína) y un grupo hemo prostético (Fig. 4) (Rodríguez-Arnaiz, 2004).

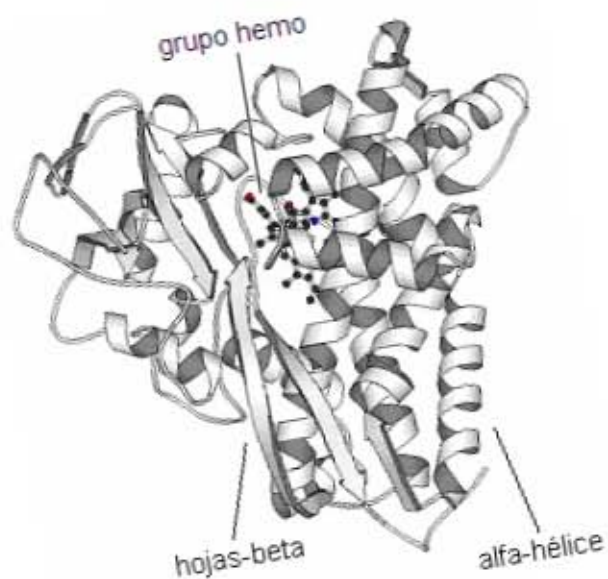


Fig. 4, Estructura de un citocromo P450. ([www.citocromos.com/induccio.html](http://www.citocromos.com/induccio.html)).

La enorme diversidad que presentan los citocromos P450 está bien definida en cuanto a las reacciones que catalizan, así como por la diversidad de sustratos sobre los cuales actúan. En el metabolismo se llevan a cabo reacciones tales como la oxidación, la peroxidación y la reducción de esteroides, ácidos grasos, prostaglandinas, feromonas y alcaloides o productos secundarios de plantas. Estas enzimas, al intervenir en procesos tales como la inactivación de muchos compuestos tóxicos, son indispensables para la

supervivencia de los organismos en ambientes adversos (Rodríguez-Arnaiz, 2003).

Los citocromos P450 intervienen en procesos de gran importancia para los insectos, como son: el crecimiento y el desarrollo, a través del procesamiento de ácidos grasos y feromonas. De igual manera, catalizan un amplio rango de reacciones enzimáticas de una gran diversidad de compuestos que se encuentran en el ambiente (o compuestos exógenos). Por ejemplo, podemos mencionar la biotransformación de productos secundarios de plantas y de productos químicos que el hombre utiliza para sus cultivos, como los insecticidas. En los insectos estas enzimas se expresan en el tubo digestivo de las larvas y en los cuerpos grasos, además en el aparato reproductor en la etapa adulta y en los tubos de Malpigi (Rodríguez-Arnaiz, 2004).

Se sabe que los genes P450 en insectos pertenecen a 25 familias, de las cuales las isoformas de la familia CYP6 son específicas de los insectos, mientras que la familia CYP4 de los insectos presenta homología con secuencias de vertebrados.

#### **4. Metabolismo.**

El metabolismo se puede definir como el conjunto de reacciones químicas que se llevan a cabo en los organismos, para transformar las sustancias absorbidas en energía o para la construcción de elementos estructurales. La transformación y construcción de las sustancias absorbidas se realizan mediante las denominadas rutas metabólicas.

Se denomina ruta metabólica a la serie de reacciones enzimáticas consecutivas que tienen por objeto generar diferentes productos, estas rutas se

encuentran divididas a su vez en dos categorías fundamentales: las vías que intervienen en la degradación de los compuestos químicos, llamadas “catabolismo”, y las vías implicadas en la construcción de moléculas o “anabolismo” (Rodríguez-Arnaiz, 2004) (Fig. 5).

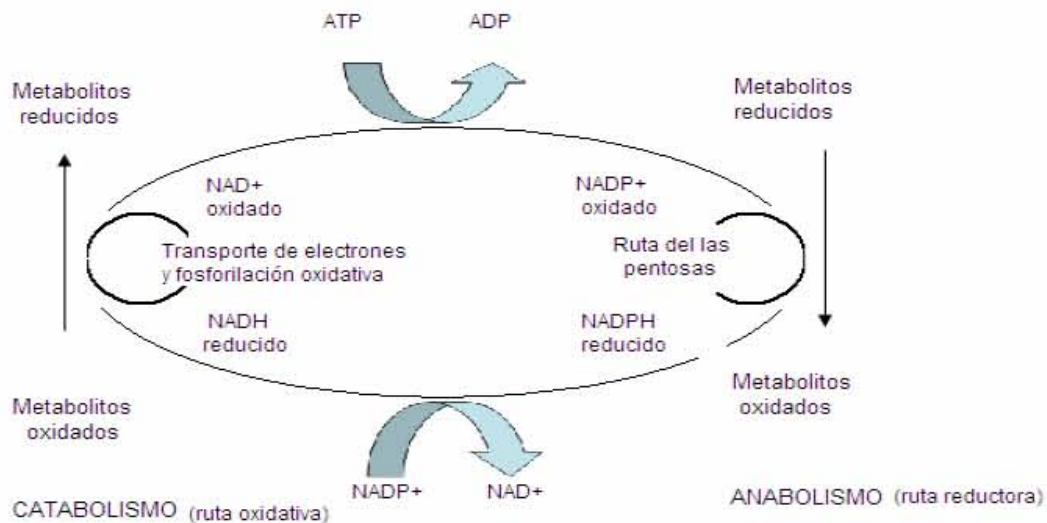


Fig. 5 Rutas metabólicas que participan en la degradación de compuestos químicos, así como en la construcción de moléculas indispensables en los organismos. (Modificado de Rodríguez-Arnaiz, 2004).

Todos los seres vivos usan básicamente las mismas reacciones para producir energía, la cual es indispensable para mantener sus procesos vitales, esto quiere decir que utilizan los mismos tipos de mecanismos y compuestos para construir sus macromoléculas y para sintetizar los compuestos fundamentales que actúan en las diferentes reacciones bioquímicas que se llevan a cabo en los seres vivos (Fig. 6) (Nelson y Cox, 2001).

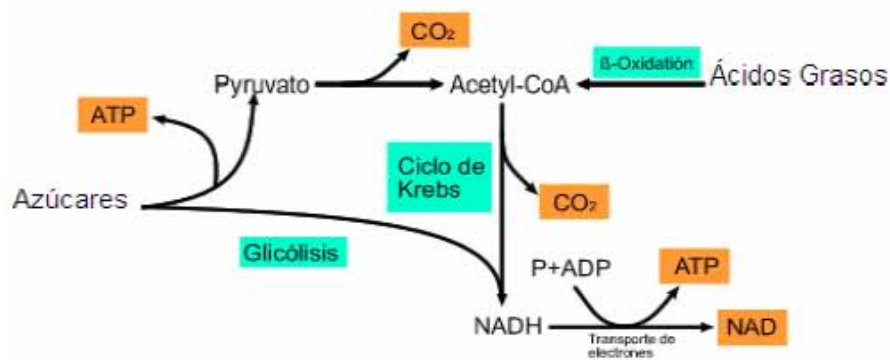


Fig. 6, Rutas del metabolismo energético. (www. omega.ilce.edu.mx).

El metabolismo es sumamente complejo y si se llegan a producir errores en determinados pasos de alguna secuencia metabólica, se puede ocasionar la pérdida o disfunción de alguna enzima de la vía y por consiguiente bloquear la ruta metabólica en cuestión (Rodríguez-Arnaiz, 1994).

Es importante mencionar que las enzimas que intervienen en el metabolismo de los nutrientes y sus productos son utilizadas de igual manera para eliminar compuestos tóxicos que son potencialmente dañinos para el organismo. La eficiencia de estas enzimas para eliminar los compuestos potencialmente nocivos tiene un límite, el cual está determinado por la dosis a la que el organismo es expuesto (Rodríguez-Arnaiz, 1994).

Es un hecho que las células han estado en contacto con las toxinas desde que las primeras formas de vida aparecieron sobre la Tierra, lo que significa que desde siempre han estado presentes los mecanismos de desintoxicación (Rodríguez-Arnaiz, 1994).

Cuando un agente potencialmente dañino entra al organismo, puede seguir dos caminos diferentes, por esta razón se les ha clasificado como de acción directa o de acción indirecta, ya sea que es reactivo por si mismo o que requiera ser

activado por las enzimas del metabolismo (en cuyo caso se les denomina promutágenos o pretóxico) (Rodríguez-Arnaiz, 2003).

## **5. Diabetes.**

El término “diabetes” describe un trastorno crónico del metabolismo de los hidratos de carbono, las grasas y las proteínas, originado por la alteración de la insulina, lo que provoca la acción inadecuada de la misma. Se sabe que existen diversos factores que pueden desencadenar la enfermedad. En el caso de la diabetes mellitus tipo II, dichos factores se han clasificado en dos grandes grupos: los no modificables o genéticos y los modificables o ambientales; entre estos últimos figuran el sedentarismo, tabaquismo y la obesidad, ésta última es considerada el elemento detonador de la enfermedad. En el caso de la diabetes mellitus tipo I aún no se sabe con certeza los factores que desencadenan la enfermedad; por tal motivo es muy difícil establecer patrones para prevenirla (Fernández-Mejía, 1996).

La diabetes mellitus es una enfermedad que de acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (WHO) afecta a cerca de 176 millones de personas a nivel mundial. En México se sabe que el número de personas diabéticas se incrementó en el 2002 de manera notable, llegando a una cifra de 2 millones de personas afectadas, lo cual hace suponer que para el 2030 existirán más de 6 millones de personas afectadas por este padecimiento en nuestro país (Andrade y Heinrich, 2005).

De acuerdo con el Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), en el 2001 la diabetes estaba considerada como la principal causa de muerte en nuestro



país ([www.ssm.gob.mx](http://www.ssm.gob.mx)). Hoy en día se sabe que la diabetes deriva en una serie de complicaciones que pueden llevar hasta la muerte a los enfermos ya que se pueden presentar complicaciones tanto microangiopáticas, en especial renales y oculares, así como macroangiopáticas, con afección a las arterias, enfermedades vasculares periféricas y neuropatías, debido al nivel de alteración que sufre el individuo en su metabolismo (Islas y Revilla, 1999).

### **5.1 Tipos de Diabetes**

La diabetes se ha clasificado en dos tipos principales:

- La diabetes Mellitus Insulinodependiente (DMID), o de tipo I, suele aparecer en la infancia o juventud (menores de 30 años), aunque puede presentarse a cualquier edad. En el desarrollo de este proceso se involucran factores genéticos, infecciosos e inmunológicos, que desencadenan la destrucción de las células  $\beta$  pancreáticas, las cuales son las encargadas de la producción de insulina (Fernández-Mejía, 1996). Aparece de forma rápida y con síntomas característicos, por lo que se le ha denominado el “Síndrome de las tres P”: el cual hace referencia a beber mucho o “Polidipsia”, orinar mucho o “Poliuria”, así como comer mucho o “Polifagia”. Los enfermos que tienen este tipo de diabetes representan entre el 10 y 15 % del total (Islas y Revilla, 1999).

- La diabetes Mellitus no Insulinodependiente (DMNID), o de tipo II, es la más común: entre el 85 y el 90% de los diabéticos pertenecen a este tipo. Aparece con mayor frecuencia en personas mayores de 40 años con sobrepeso u obesidad. En ella se ha podido determinar un componente genético que, a partir de los 45 años de edad genera la alteración de la forma de la insulina, por lo que su acción es ineficiente, ya que los receptores a los cuales debe

unirse no logran reconocerla. Por esta razón, se le ha llamado “resistencia periférica a la insulina” (Fig.6). Este tipo de diabetes puede ser controlada mediante dieta, ejercicio físico y medicamentos (como la glibenclamida), aunque en ocasiones también puede necesitar insulina. El comienzo es lento y gradual, sin síntomas "típicos", por lo que puede pasar desapercibida y permanecer sin ser diagnosticada durante años, aunque se puede sospechar cuando el paciente llega a presentar irritación ocular frecuente, poliuria y prurito (comezón en el cuerpo) (Fernández-Mejía, 1996).

Existe un tercer tipo de diabetes, mucho menos frecuente, llamada “diabetes secundaria”. Ésta puede derivar en una diabetes mellitus insulino dependiente (DMID) o bien en una diabetes mellitus no insulino dependiente (DMNID); pero se distingue de ellas porque aparece como causa secundaria de una enfermedad, tales como: acromegalia, síndrome de Cushing, hipertiroidismo o por extracción quirúrgica del páncreas (Fernández-Mejía, 1996).

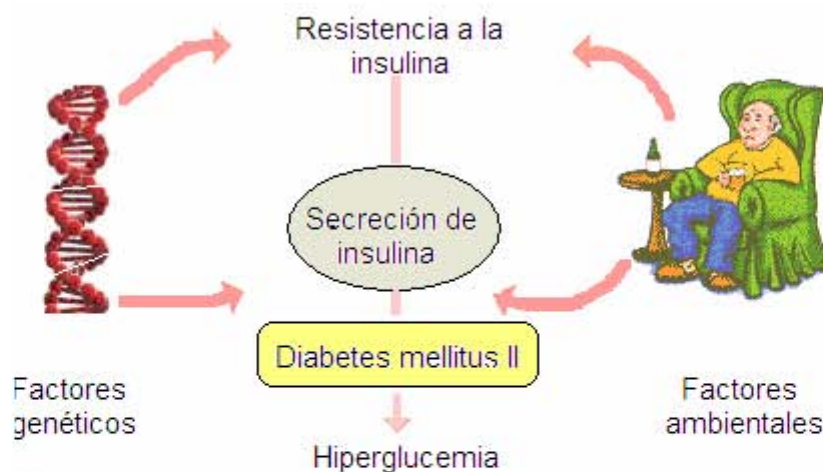


Fig.7 Diagrama en el que se muestran los factores que pueden desencadenar la diabetes mellitus tipo II. (Modificado de [www.gesundheit.de](http://www.gesundheit.de)).

## **6. Toxicología.**

La toxicología se dedica a la identificación y cuantificación de los efectos asociados a la exposición a agentes físicos, químicos y biológicos.

Abarca desde estudios de investigación básica sobre el mecanismo de acción de los agentes tóxicos hasta la elaboración e interpretación de pruebas normalizadas para determinar las propiedades tóxicas de los agentes (Rodríguez-Arnaiz, 2004).

### **6.2 Toxicología Genética.**

Es una disciplina científica que se dedica a identificar y analizar la acción de agentes tóxicos que interactúan con el material genético de los organismos (a estos compuestos se les denomina compuestos genotóxicos). Tiene como objetivo la detección de estos agentes (ya sean físicos, químicos o biológicos) potencialmente dañinos, su análisis y la comprensión de cada una de sus propiedades. Es una ciencia multidisciplinaria, que pretende establecer la correlación que existe entre la exposición a agentes xenobióticos y la inducción de alteraciones genéticas tanto en las células germinales como en las células somáticas de los organismos. Y con base en esto, comprender plenamente los efectos que poseen las toxinas que se encuentran en el entorno y el daño que causan al material genético de los organismos (Rodríguez-Arnaiz, 2004).

Esta disciplina se inicia formalmente con dos experimentos cruciales, en los cuales se demostró el potencial dañino de agentes físicos y químicos que interactúan directamente con el DNA. El primero de ellos se realizó en 1927 (H. J. Muller) utilizando rayos X y el segundo en 1949 (Auerbach y Robson) con gas mostaza, en ambos casos se usó como modelo biológico a *Drosophila*

*melanogaster* (Vogel, 1991). Posteriormente se demostró que los productos químicos son mucho más peligrosos en cuanto al hecho de producir alteraciones genéticas heredables. Esto causó gran preocupación y a la vez gran interés por saber si las enfermedades hereditarias que se presentaban en la población eran provocadas por agentes dañinos que se encuentran en el ambiente (Rodríguez-Arnais, 2004).

La toxicología genética se centra en la detección de alteraciones genéticas como mutación puntual, aberraciones cromosómicas y aneuploidías, provocados por agentes genotóxicos. Es evidente que muchos agentes que causan daño al DNA, también son recombinogénicos, lo cual es de gran importancia ya que se sabe que la recombinación puede ser responsable de la pérdida de heterocigosis tanto en las células germinales como somáticas; y en consecuencia puede promover la expresión de enfermedades hereditarias causadas por alelos recesivos o estar involucrada en la progresión de neoplasias (Dueñas, 2002).

## **7. *Drosophila melanogaster*.**

El organismo que por excelencia se ha utilizado como modelo experimental para el estudio de la genética, desde que esta disciplina se estableció a principios del siglo XX, es *Drosophila melanogaster*, debido a que es un organismo eucarionte y pluricelular, siendo además un excelente modelo para realizar experimentos *in vivo*: presenta un tamaño pequeño (~3 mm en estado adulto), lo que hace que se pueda cultivar a un gran número de individuos en espacios reducidos obteniendo varias generaciones en un tiempo corto, asimismo, tiene un ciclo de vida corto, dimorfismo sexual y un número pequeño de cromosomas que están completamente mapeados, además de presentar gran sensibilidad a compuestos potencialmente dañinos, ya que tiene genes implicados en el metabolismo de xenobióticos, los cuales funcionan de manera similar a la de los humanos, siendo por esta razón un excelente modelo para la Toxicología Genética (Rodríguez –Arnaiz 2003).

Existen dos hechos fundamentales que han permitido que este organismo sea ideal para evaluar el efecto producido por diferentes compuestos:

- 1) No se presenta recombinación meiótica en los machos.
- 2) Existen cepas con cromosomas balanceadores, lo cual es fundamental, ya que permite que cepas que poseen marcadores que son letales en condiciones homocigas puedan mantenerse ya que no permite la recombinación meiótica entre cromosomas homólogos (Saner *et al.*, 1996).

Actualmente se cuenta con varias cepas, que poseen marcadores genéticos específicos, con los cuales se puede hacer evaluaciones *in vivo* de compuestos específicos y sus efectos sobre determinados genes o sus

productos. Estos marcadores genéticos son cualitativos y se pueden cuantificar morfológicamente, ya sea por pérdida o por aparición de marcadores tanto en células germinales como en células somáticas, esto generado por mutaciones, deleciones o recombinación mitótica por la exposición al agente xenobiótico. Fundamentalmente, se cuenta con tres ensayos con los que se ha validado el daño en las células, estos son:

- 1) El ensayo de mutaciones letales recesivas ligadas al sexo.
- 2) La prueba cromosómica.
- 3) Ensayo de mutación somática y recombinación mitótica, la cual se aplica tanto en ala como en ojo (Graf *et al.*, 1984).

### **7.1 Biología del Desarrollo de *Drosophila melanogaster***

*Drosophila melanogaster* presenta un ciclo de vida de 10 días, a 25° C y 60% de humedad relativa (Fig. 8). El ciclo de vida comienza poco después de que el esperma llega a los huevos y la hembra los oviposita, estos huevos tienen una longitud promedio de 430 micras y un color blanco lechoso, veinticuatro horas después, el huevo eclosiona y surge la larva. El período larvario consta de tres estadios. En el tercer estadio la larva consume aproximadamente cinco veces su peso en comida, lo que provoca que aumente su tamaño con gran rapidez alcanzando una longitud de ~ 4.5 mm. Posteriormente, pasan a ser prepupas, pupas, y finalmente, imagos o adultos. (Demerc y Kaufmann, 1962).

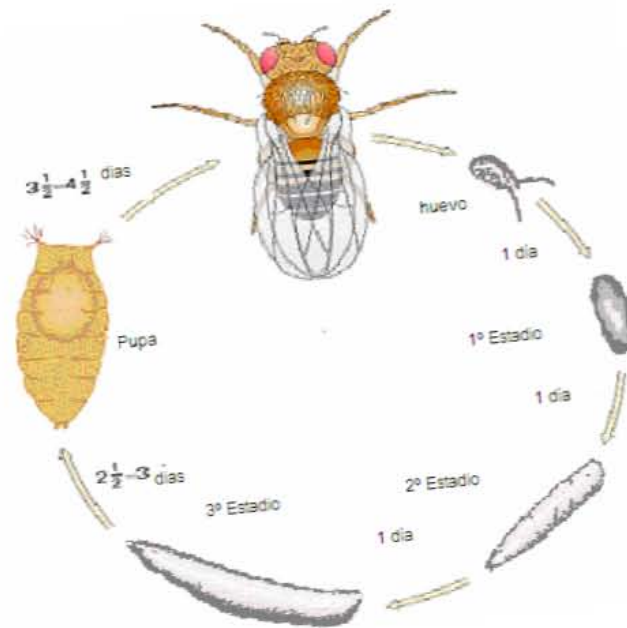


Fig.8. Ciclo de vida *D. melanogaster*. Modificado de Demerc y Kaufmann, 1962

Las células que conforman el cuerpo de las larvas provienen de dos estirpes celulares distintas: una es el tejido larvario y la otra está constituida por las células de los discos imaginales que en un futuro darán origen a las estructuras y tejidos del adulto (Russell, 1998). Estos discos están conformados por un promedio de entre 50 a 100 células. En el primer estadio estas células siguen un desarrollo asincrónico hasta alcanzar aproximadamente las 30,000 células, momento en el cual comienza la diferenciación de las estructuras (Fig. 9). Podemos distinguir un linaje de otro debido a que las células de los discos imaginales presentan un tamaño pequeño; y además, una constitución cromosómica diploide, aunado al hecho de estar determinadas genéticamente para alcanzar su diferenciación hasta la metamorfosis (Pearson, 1974).

Después de que las moscas emergen, tardan un tiempo aproximado de 8 horas para alcanzar la madurez sexual y poder empezar a reproducirse (Demerc y Kaufmann, 1962).

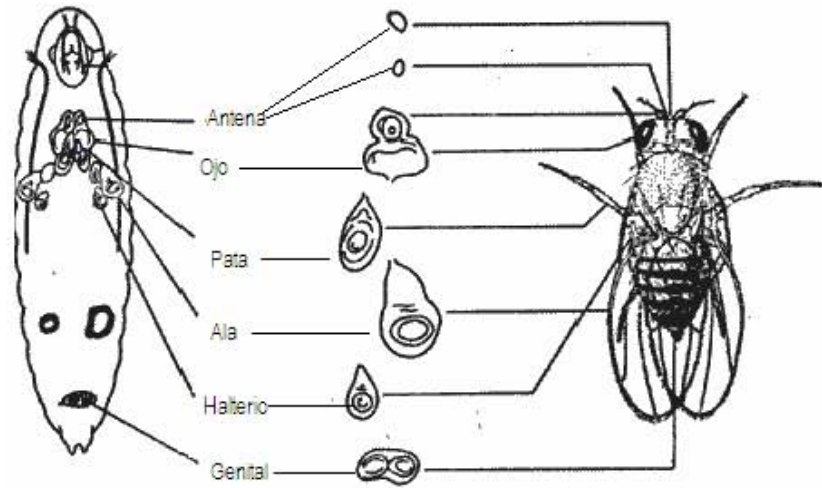


Fig. 9 Distribución de los discos imagales. Modificado de Demerc y Kaufmann, 1962



## 7.2 Prueba de mutación y recombinación somáticas (SMART).

La prueba de mutación y recombinación somáticas (SMART) se basa en la pérdida de la heterocigosidad de marcadores en las células de los discos imaginales de las larvas, las cuales, en el caso del ala son, "*flare<sup>3</sup>*" y "*mwh*". Esta prueba ha mostrado ser sumamente eficiente debido a que es un bioensayo a corto plazo en el cual se detectan mutaciones puntuales, deleciones, no disyunción, aneuploidías y recombinaciones mitóticas, provocadas por la exposición a agentes que dañan al material genético. Cuando los individuos son puestos en contacto con un agente potencialmente genotóxico e interactuar con el DNA, se expresará como manchas en las células de las alas (Fig. 10), las cuales pueden ser analizadas al comparar si existen diferencias estadísticamente significativas entre el tipo y frecuencia de manchas de los organismos no expuestos y los expuestos (Graf, 1995).

Se han realizado múltiples experimentos que han validado la eficacia de esta prueba utilizando tanto agentes físicos como químicos, puros y mezclas (Graf *et al.*, 1996; Vogel, 1991).

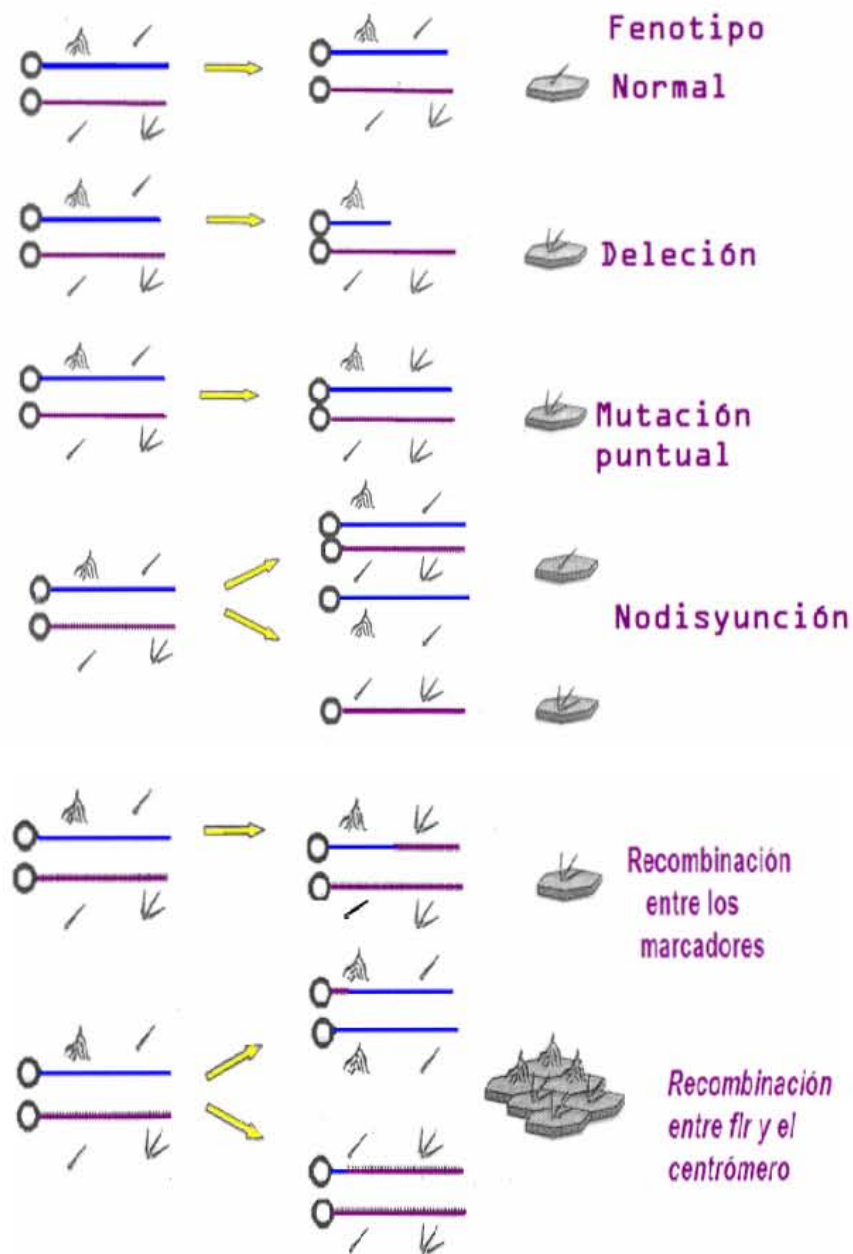


Fig. 10. Eventos que conducen a la pérdida de la heterocigosis y que detecta el ensayo de mutación y recombinación somáticas SMART. (Modificado de Graf *et al.*, 1984).

El bioensayo SMART presenta varias ventajas: requiere una sola generación para obtener resultados, es un sistema donde se puede estudiar la activación de los compuestos químicos (procancerígenos y promutágenos), además este sistema *in vivo* puede evaluar mutaciones y recombinaciones mitóticas. Es importante mencionar que con este bioensayo se pueden analizar cerca de 25,000 células por ala (Graf *et al.*, 1984).

## 8. Justificación

Nuestro mundo gira alrededor de grandes adelantos científicos y tecnológicos que abren paso a grandes descubrimientos en todos los ámbitos. A pesar de ello el hombre ha invertido gran parte de sus esfuerzos en la búsqueda de nuevos medicamentos (de bajo costo) que puedan curar enfermedades de gran importancia a nivel mundial entre las que destacan: el VIH (sida), cáncer y diabetes, siendo esta última una de las principales causas de muerte en nuestro país. En este ámbito cabe destacar que el uso de plantas medicinales, hoy en día juega un papel fundamental ya que posee un panorama muy prometedor, siendo una alternativa viable y real en el desarrollo de nuevas técnicas terapéuticas, además de sus bajo costo (Kufer *et al.*, 2005).

Existen diversos reportes sobre compuestos aislados de plantas de los cuales se han podido desarrollar diversos medicamentos, en este sentido es importante mencionar que para que un medicamento pueda ser utilizado debe de someterse a diversas pruebas que evalúen su toxicidad, genotoxicidad, mutagénesis, teratogénesis, carcinogénesis, etc. (Kufer *et al.*, 2005). Por esta razón el objetivo del presente trabajo fue evaluar tanto la actividad genotóxica como tóxica del extracto acuoso de *Malmea depressa*, ya que se ha comprobado su efecto hipoglucemiante, siendo una alternativa viable para desarrollar un mejor medicamento para controlar la diabetes mellitus tipo II.

### **9.1 Objetivo General.**

-Determinar si existe un efecto genotóxico inducido por el extracto de *Malmea depressa* mediante el empleo de células somáticas del ala de *Drosophila melanogaster*.

### **9.2 Objetivos Particulares.**

- Determinar si el extracto actúa de forma directa o indirecta (activación metabólica)

- Comparar la respuesta en la actividad mutagénica y recombinogénica con respecto al metabolismo en las dos cruzas: la estándar y la de alta bioactivación.

-Evaluar la toxicidad del extracto acuoso de *M. depressa* tanto en larvas como en adultos, mediante un tratamiento crónico.

-Determinar si existen diferencias estadísticamente significativas entre la frecuencia de manchas obtenidas en cada cruce de los tratamientos con respecto al testigo negativo.

## **10. Hipótesis.**

### **Ho:**

El extracto de *Malmea depressa* no producirá un efecto genotóxico, por lo que la frecuencia de manchas en las series tratadas y el testigo concurrente no serán estadísticamente distintas.

### **Ha:**

El extracto de *Malmea depressa* producirá un efecto genotóxico, lo que será reflejado en una frecuencia significativamente mayor de manchas en las series tratadas que en el testigo concurrente.

## 11. Métodos.

### 11.1 Cepas.

Se utilizaron tres cepas de *D. melanogaster*: "multiple wing hair" (*mwh e / mwh e*), "flare" (*flr<sup>3</sup> / TM3 e Bd<sup>S</sup>*) y "Oregon flare" (ORR *flr<sup>3</sup> / TM3 e Bd<sup>S</sup>*). La cepa *mwh e* ("multiple wing hair") presenta una mutación recesiva localizada en el brazo izquierdo del cromosoma 3 (3-0.3 cM) y su expresión fenotípica se observa como un cambio en el número de tricomas por célula (Graf *et al.*, 1996).

El marcador *e* (ébano) se caracteriza por el color negro brillante del cuerpo. En la cepa *flr<sup>3</sup>* (flare) la mutación es recesiva y se expresa como tricomas mal formados y cortos con apariencia de flama. Se sabe que es una mutación letal en condición homocigótica, por lo cual cuenta con un balanceador TM3, el cual a su vez tiene un marcador a nivel fenotípico que es el borde de las alas aserradas (*Bd<sup>S</sup>*).

La cepa ORR-*flr<sup>3</sup>* (Oregon resistente) tiene una mutación que le confiere resistencia al DDT e insecticidas organofosforados, ya que posee una sobre expresión de los genes P450, lo que le permite biotransformar agentes tóxicos con mayor facilidad (Graf *et al.*, 1996).

### 11.2 Sistemas de Cruza.

Este ensayo fue realizado de acuerdo con Graf y sus colaboradores (1984), con la modificación de el marcador *e* (ébano), lo cual fue implementado por el laboratorio de genética de la Facultad de Ciencias UNAM, con el objetivo de que 50% de la progenie obtenida (F1) expresará el marcador ébano (*e*) siendo mas fácil separar a las moscas heterocígas, las cuales presentan el cuerpo

oscuro (ébano). Para la realización de este ensayo, se utilizaron dos diferentes tipos de cruzas:

1) Cruza de alta bioactivación (HB), que expresa altos niveles de citocromos P450 (hembras vírgenes de la línea ♀♀ (ORR *flr<sup>3</sup>*/TM3 e *Bd<sup>S</sup>*) X machos ♂♂ *mwh e/mwh e*) (Graf y Van Shaik, 1992).

2) Cruza estándar (ST), que expresa niveles basales de estas enzimas (hembras vírgenes de la línea ♀♀ *flr<sup>3</sup>*/TM3 e *Bd<sup>S</sup>* X machos de la cepa ♂♂ *mwh e/mwh e*) (Graf et al, 1989) (Fig.11).

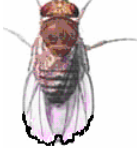

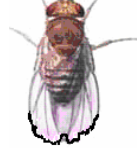

	CRUZA DE ALTA BIOACTIBACION	CRUZA ESTANDAR
Progenitores	<p>A) Hembras  Machos </p> <p>(ORR <i>flr<sup>3</sup></i>/TM3 e <i>Bd<sup>S</sup></i>)X<i>mwh e/mwh e</i></p>	<p>B) Hembras  Machos </p> <p><i>flr<sup>3</sup></i>/TM3 e <i>Bd<sup>S</sup></i>X <i>mwh e/mwh e</i></p>
F1	<p>C) ½ ORR <i>flr<sup>3</sup></i>/ <i>mwh e</i> (alas silvestres)            ½<i>mwh, e</i> / TM3 e <i>Bd<sup>S</sup></i> (alas con bordes discontinuos, cuerpo ébano)</p>	<p>D) ½ <i>flr<sup>3</sup></i>/<i>mwh e</i> (alas silvestres)            ½ <i>mwh e</i>/ TM3e <i>Bd<sup>S</sup></i> (alas aserradas, cuerpo ébano)</p>

Fig. 11 Sistemas de crusa A) y B) muestran los progenitores de ambas cruzas, mientras que C) y D) muestran a la progenie que se obtuvo y en las cuales se realizo la evaluación del extracto de *M. depressa*.

### **11.3 Prueba de Toxicidad.**

Para la prueba de toxicidad se utilizaron 200 machos adultos de la cepa "flare" (*flr<sup>3</sup> /TM3, Bd<sup>S</sup>*) y 50 larvas de la cepa "flare" (*flr<sup>3</sup> /TM3, Bd<sup>S</sup>*), ambos grupos fueron sometidos al mismo tratamiento. Tanto las larvas como moscas fueron alimentadas durante 48 horas con extracto acuoso de *Malmea depressa*, con las siguientes concentraciones: 0.166, 3.3, 6.6, 13.3, 26.0 mg/ml y el control (agua destilada). Estas concentraciones se determinaron considerando el trabajo de Martínez, 2004, en el cual se administro a ratas diabéticas una cantidad de 20 mg de extracto por kilogramo de peso, extrapolando lo anterior al peso de la mosca se calculo una concentración de 0.166 mg/ml. Una vez que fue determinada la cantidad que le correspondía a una mosca, la siguiente concentración se obtuvo duplicando la inicial; además, esto permitió descubrir si existía toxicidad a una mayor concentración.

### **11.4 Extracto.**

Se utilizó extracto de raíz homogeneizado y liofilizado de *Malmea depressa*, el cual fue proporcionado por el Dr. Andrade Cetto del grupo de Etnofarmacología, Facultad de Ciencias, UNAM.

### **11.5 Medio de Cultivo.**

El medio de cultivo se elaboró con los siguientes ingredientes: Agar (10 gr), azúcar (70 gr), harina (105 gr), levadura de cerveza (60 gr.) y agua (1250ml). Se pesaron y mezclaron todos los ingredientes; una vez homogénea la mezcla, se le agregó el agua destilada. Posteriormente se puso a cocer, moviéndolo constantemente; una vez que comenzó a hervir, se le bajó al fuego y se dejó



por 15 minutos más. Por último, se retiró del fuego y cuando el medio estuvo a 60° se le agregó 4 ml. de ácido propiónico (fungicida) y 4 ml. de nipagín al 10% en alcohol etílico (bactericida).

### **11.6 Ensayo SMART.**

Ambas cruas fueron realizadas de acuerdo al protocolo establecido por Graf y sus colaboradores (1989), con la única variante en los machos, los cuales son *mwh e*, presentando el cuerpo color oscuro. Posteriormente se sincronizaron por un período de 6 horas en medio de cultivo con levadura fresca, retirando a los progenitores una vez transcurridas 6 h, lo cual se realizó con el fin de obtener huevos con una diferencia de edad de  $72 \pm 3$  horas. Posteriormente las larvas fueron extraídas de los frascos con sacarosa al 20% y una malla. A estas larvas se les administró un tratamiento agudo por duplicado con cinco concentraciones diferentes de extracto acuoso de *Malmea depressa* (0.166, 3.3, 6.6, 13.3, 26.0 mg/ml) y el control negativo (agua destilada). Esto se hizo colocando aproximadamente 200 larvas por vial, los cuales estaban perforados por ambos extremos, por lo que se les colocó una malla en uno de los extremos y un tapón en el otro, con el fin de evitar que las larvas se salieran. Los viales, ya con las larvas, fueron colocados a su vez en vasos de precipitado de 10ml, los cuales contenían 50mg de celulosa en polvo y las distintas concentraciones de *M. depressa*. Después de 6 horas las larvas fueron retiradas de los viales, enjuagándolas con agua corriente; para posteriormente colocarlas en medio de cultivo nuevo, donde se dejó que concluyera su ciclo de vida. Una vez que emergieron las moscas, se fijaron en

etanol al 70%, separando a la progenie de acuerdo al fenotipo que presentaron: transheterocigotas ( $mwh +/ + flr^3$ ) con alas y cuerpo silvestre o portadoras del balanceador (TM3 e  $Bd^S$ ), las cuales presentan alas con bordes discontinuos y cuerpo oscuro (o ébano). Una vez separada la progenie, se utilizó a la progenie transheterocigota, a la cual se le disectaron las alas con ayuda de una pinza de relojero y una aguja de disección, colocándolas por pares en portaobjetos con solución de Fauré (Fig. 12). En cada preparación se montaron 10 pares de alas de hembras y 10 pares de alas de machos (Graf *et. al.*, 1984).



Fig.12 Forma en la que se colocaron las alas para ser observadas al microscopio óptico a 40X. Laboratorio de genética, Facultad de ciencias.

Para analizar las alas, únicamente se tomó en cuenta la región distal de las alas, analizando las 7 regiones que conforman el ala (Fig. 13) (García-Bellido y Merriam, 1971).

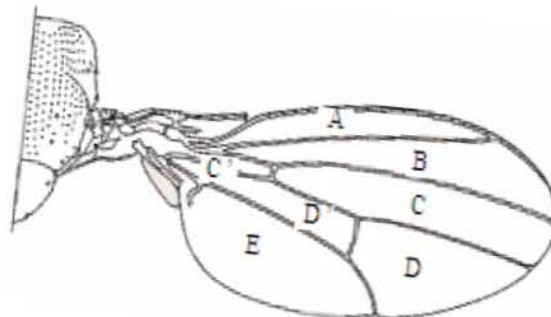


Fig. 13, Zonas del ala. Modificado de Graf, 1984.

Se utilizó un microscopio óptico para el análisis de las alas con un aumento de 40X. Las manchas se registraron tomando en cuenta tanto la sección del ala en la que aparecieron así como el número de células afectadas y su tipo, esto es: *mwh* y *flr* o gemela (presencia de los dos marcadores *mwh* y *flr*<sup>3</sup>).

(Fig.14) Fue asignada una clasificación a cada mancha según su tamaño:

- Simple chica ( 1-2 células afectadas)
- Simple grande (mayor a 2 células afectadas)

Es importante mencionar que fue considerada como una mancha diferente, es decir que se generaron por dos eventos independientes, si las manchas que aparecían en la misma región del ala estaban separadas por 3 o más hileras de tricomas silvestres.

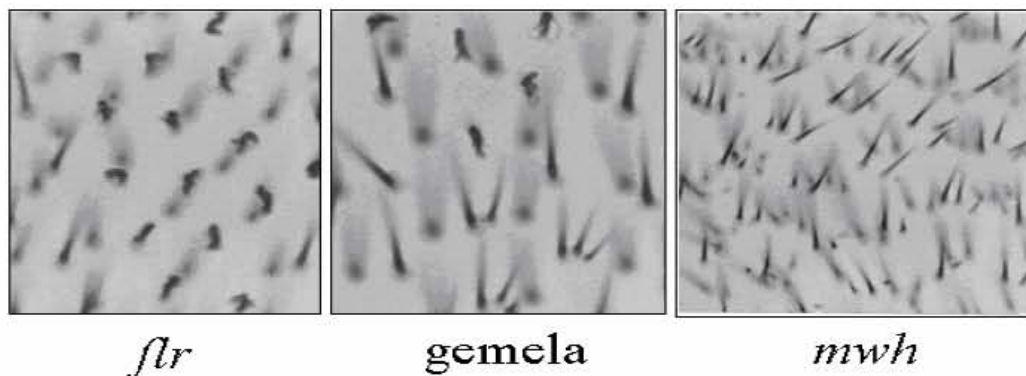


Fig. 14. Tipos de manchas encontradas en el ensayo de SMART con *M. depressa*. Laboratorio de Genética de la Facultad de Ciencias, UNAM.

## 12. Análisis estadístico.

Para el análisis estadístico de los datos obtenidos durante el ensayo, se utilizó el programa de cómputo SMART, mediante el cuál se determinó si la frecuencia de manchas sencillas chicas, sencillas grandes y gemelas, que se

obtuvieron durante el ensayo, aumentaba al ser comparada con los testigos concurrentes. Esta prueba se basa en la prueba no paramétrica de  $X^2$ , con un nivel de significancia del 5% (Frei y Wügler, 1988). Es importante destacar que es necesario comparar las series tratadas con las series del testigo para evaluar la mutagénesis de un compuesto.

Para determinar los resultados, se utilizan dos hipótesis estadísticas. La primera hipótesis,  $H_0$  ó hipótesis nula, si se acepta, supone que el tratamiento experimental no presentó una mayor frecuencia de manchas entre las series tratadas y el testigo; si la  $H_0$  se rechaza, se asumirá que por lo menos en una de las series tratadas está aumentando la frecuencia espontánea, comparada con la frecuencia obtenida en el testigo, es decir, la frecuencia espontánea está incrementando por un múltiplo dado (que es llamado  $m$ ). Asimismo, la frecuencia del testigo, la constante  $m$  es indispensable ya que indica las veces que debe incrementar el número de manchas tomando como referencia al testigo para considerar una respuesta positiva (+). La segunda hipótesis,  $H_a$  ó hipótesis alternativa, supone que en las series tratadas hay un aumento estadísticamente significativo, el cuál es determinado como “ $m$ ” veces la frecuencia basal. Esto permite inferir que si se acepta  $H_0$  y se rechaza  $H_a$ , el resultado es negativo (-), pero si se rechaza  $H_0$  y se acepta  $H_a$ , el resultado es positivo (+). Es importante mencionar que se pueden, en un momento determinado aceptar ambas hipótesis y, por consiguiente, se tiene un resultado indeterminado (i) y si ambas se rechazan, será un débil positivo (d+) (Frei y Wügler, 1988).

### 13. Resultados.

#### 13.1 Toxicidad

Los resultados obtenidos después de haber realizado la prueba de toxicidad con moscas adultas (Tabla 1) y larvas (Tabla 2), mostraron que el extracto acuoso de *Malmea depressa* no resultó ser tóxico para ninguna de las concentraciones utilizadas, por lo que no se pudo obtener la LD<sub>50</sub>, por tal motivo, las concentraciones que se utilizaron para probar el efecto genotóxico del extracto, se determinaron partiendo de la cantidad de extracto de *Malmea depressa* que se le administró a ratas en un experimento previo (Martínez, 2004), y fueron las siguientes: 1.66, 3.3, 6.6, 13.3, 26.0  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  y el control negativo.

Tabla 1. Prueba de toxicidad, machos adultos de la cepa *flr* tratados con extracto de *Malmea depressa* por 48 hrs.

[ ] en $\mu\text{g}/\mu\text{l}$	TIEMPO										
	0hrs		12hrs		24hrs		36hrs		48hrs		
Control	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10
1.66	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10
3.3	10/10	10/10	9/10	10/10	9/10	10/10	9/10	10/10	9/10	10/10	10/10
6.6	10/10	10/10	9/10	9/10	9/10	9/10	9/10	9/10	9/10	9/10	9/10
13.3	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10
26.0	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10
Solución stock	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10

\* 9/10 Moscas que se escaparon durante el experimento

Tabla 2. Prueba de toxicidad, larvas de  $72 \pm 3\text{h}$  de edad de la cepa *flr* tratadas con extracto de *Malmea depressa* por 48 hrs.

[ ] en $\mu\text{g}/\mu\text{l}$	TIEMPO										
	0hrs		12hrs		24hrs		36hrs		48hrs		
Control	50/50	50/50	50/50	50/50	50/50	50/50	50/50	50/50	50/50	50/50	50/50
1.66	50/50	50/50	50/50	50/50	50/50	50/50	50/50	50/50	50/50	50/50	50/50
3.3	50/50	50/50	50/50	50/50	50/50	50/50	50/50	50/50	50/50	50/50	50/50
6.6	50/50	50/50	50/50	50/50	50/50	50/50	50/50	50/50	50/50	50/50	50/50
13.3	50/50	50/50	50/50	50/50	50/50	50/50	50/50	50/50	50/50	50/50	50/50
26.0	50/50	50/50	50/50	50/50	50/50	50/50	50/50	50/50	50/50	50/50	50/50
Solución stock	50/50	50/50	50/50	50/50	50/50	50/50	50/50	50/50	50/50	50/50	50/50

### 13.2 Genotoxicidad.

Para probar el posible efecto genotóxico del extracto acuoso de *Malmea depressa* se utilizó el ensayo de Mutación y Recombinación Somática (SMART) para alas, utilizando dos cruza distintas, la estándar (ST) y la de alta bioactivación (HB). Ambos experimentos fueron hechos bajo las mismas condiciones, utilizando cinco concentraciones diferentes (1.66, 3.3, 6.6, 13.3, 26.0  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) y el control negativo que en este caso fue agua destilada.

### 13.3 Cruza Estándar (ST)

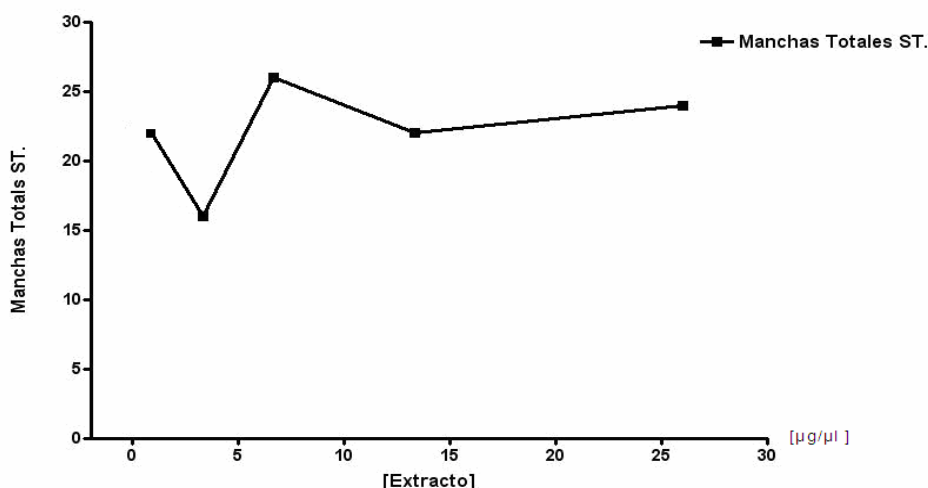
La tabla 3 muestra tanto la frecuencia como el tamaño promedio de las manchas de la cruza estándar, indicando que el extracto acuoso de *Malmea depressa* no produjo un aumento estadísticamente significativo de clones, por lo que no hubo inducción de un efecto genotóxico por parte del extracto en ninguna de las concentraciones utilizadas. La frecuencia de manchas totales muestra un patrón asintótico (Gráfica 1). La frecuencia de manchas chicas (1-2 células afectadas) es claramente mayor con respecto a la frecuencia obtenida

de manchas grandes (más de 2 células afectadas) para el caso de la cruz estandar. La gráfica 2 muestra el tamaño de clones por individuo dando un rango del 1 al 7 en el cual, 1= 1 , 2=2, 3= 3-4, 4= 5-8, 5=9-16, 6=17-32 y 7= ó mayor a 33 células afectadas.

Tabla 3. CRUZA ESTANDAR (ST) FRECUENCIA DE MANCHAS

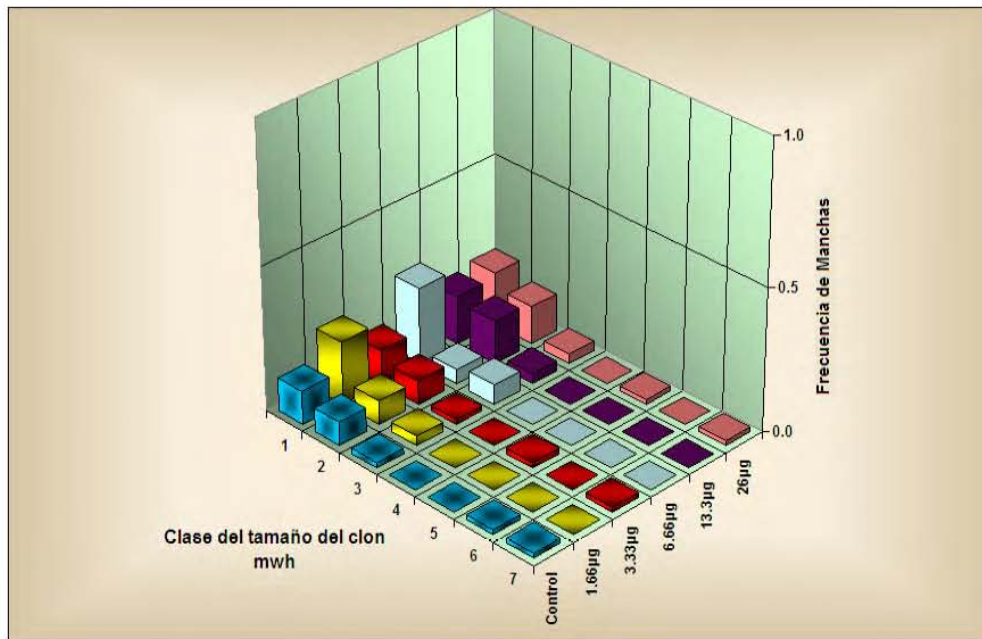
[µg/µl ]	Número de moscas	Frecuencia de manchas por individuo				
		Chicas (1-2 células) m=2	Grandes (> 2células) m=5	Gemelas m=5	Total m=2	Tamaño promedio del clon
Control	60	0.20 (12)	0.05 (3)	0.00 (0)	0.25 (15)	2.20
1.66	60	0.30 (18)-	0.03 (2)-	0.03 (2)-	0.37 (22)-	1.59
3.3	60	0.20 (12)-	0.05 (3)-	0.02 (1)-	0.27 (16)-	2.25
6.66	60	0.32 (19)-	0.07 (4)-	0.05 (3)i	0.43 (26)-	1.69
13.3	60	0.32 (19)-	0.03 (2)-	0.02 (1)-	0.37 (22)-	1.64
26.0	60	0.32 (19)-	0.07 (4)-	0.02 (1)-	0.40 (24)-	1.59

Análisis estadístico de acuerdo a Frei y Wüerler (1988) En el cual: += positivo; - = negativo; i= indeterminado; d+0 débil positivo; m= factor de multiplicación. Nivel de probabilidad:  $\alpha=\beta=0.05$  (prueba estadística de una sola cola).



Gráfica 1. Frecuencia de manchas totales inducidas por el extracto acuoso de *Malmea depressa* en la cruz estandar ST, el cual muestra un patrón asintótico.

## CRUZA ST



Gráfica 2. Cruza estándar. Se muestra el número y el tamaño de manchas simples obtenidas durante el tratamiento agudo (6hrs).

### 13.4 Cruza de Alta Bioactivación (HB)

En el caso de la cruza de alta bioactivación (HB) no se presentó un aumento estadísticamente significativo, siendo el potencial genotóxico del extracto acuoso de *Malmea depressa* negativo para las concentraciones probadas. La tabla 3 muestra la frecuencia de manchas obtenidas en el ensayo así como el tamaño promedio del clon. La respuesta mostró también un patrón asintótico (Gráfica 3). La gráfica 5 muestra que no existe relación entre la cantidad de compuesto y el número de manchas en ambas cruza. En este caso también se encontró una frecuencia mucho mayor de manchas chicas (1-2 células afectadas) que de manchas grandes (más de 2 células afectadas). La gráfica 4 muestra el tamaño de los clones por individuo en las series tratadas. Es

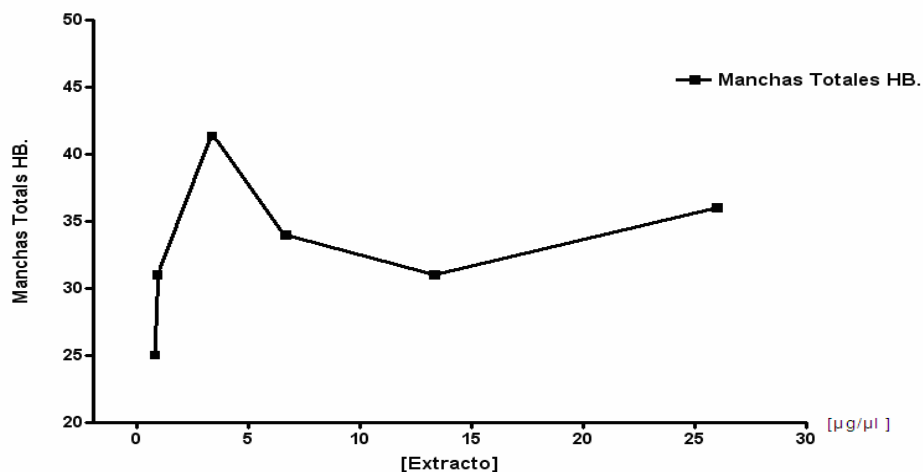


importante mencionar que en esta cruz no se registró la presencia de manchas gemelas.

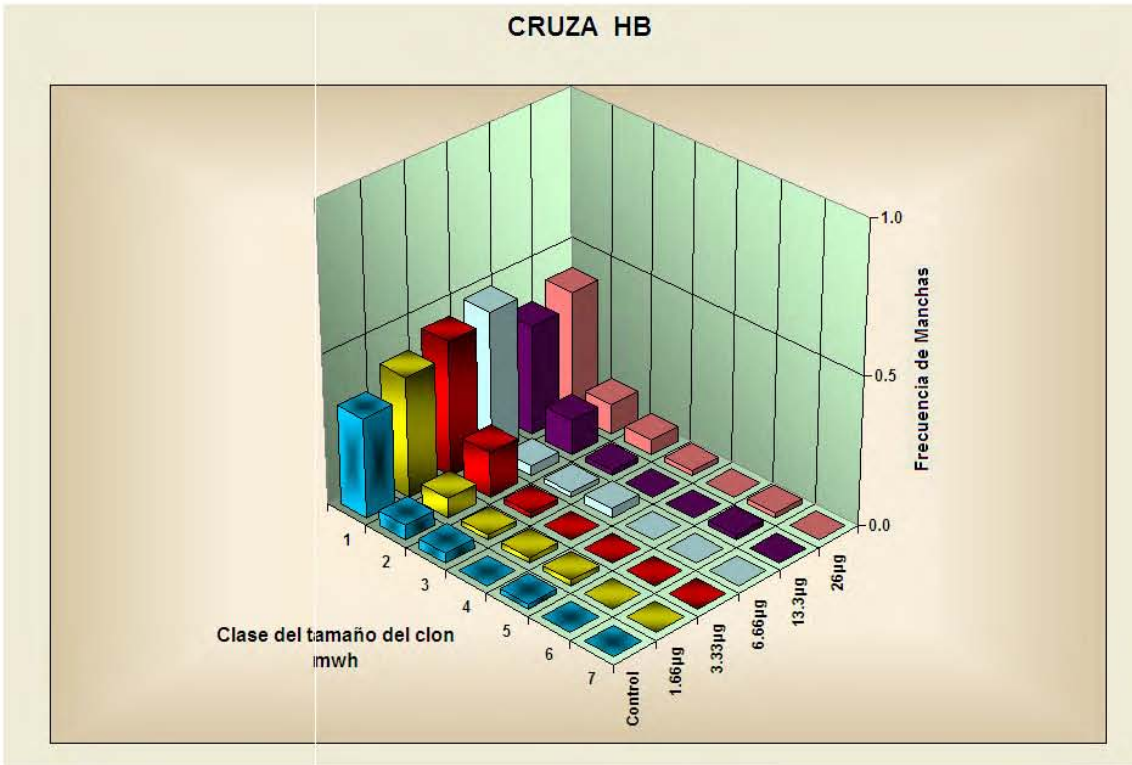
Tabla 4. CRUZA DE ALTA BIOACTIVACIÓN (HB) FRECUENCIA DE MANCHAS.

[µg/µl ]	Número de moscas	Frecuencia de manchas				
		Chicas (1-2 células) M=2	Grandes (> 2células) m=5	Gemelas m=5	Total m=2	Tamaño promedio del clon
Control	60	0.38 (23)	0.05 (3)	0.00 (0)	0.43 (26)	1.42
1.66	60	0.47 (28)-	0.05 (3)-	0.00 (0)	0.52 (31)-	1.42
3.33	60	0.66 (40)-	0.02 (1)-	0.00 (0)	0.66 (41)-	1.28
6.66	60	0.52 (31)-	0.05 (3)-	0.00 (0)	0.57 (34)-	1.29
13.3	60	0.48 (29)-	0.03 (2)-	0.00 (0)	0.52 (31)-	1.45
26.0	60	0.52 (31)-	0.08 (5)-	0.00 (0)	0.60 (36)-	1.56

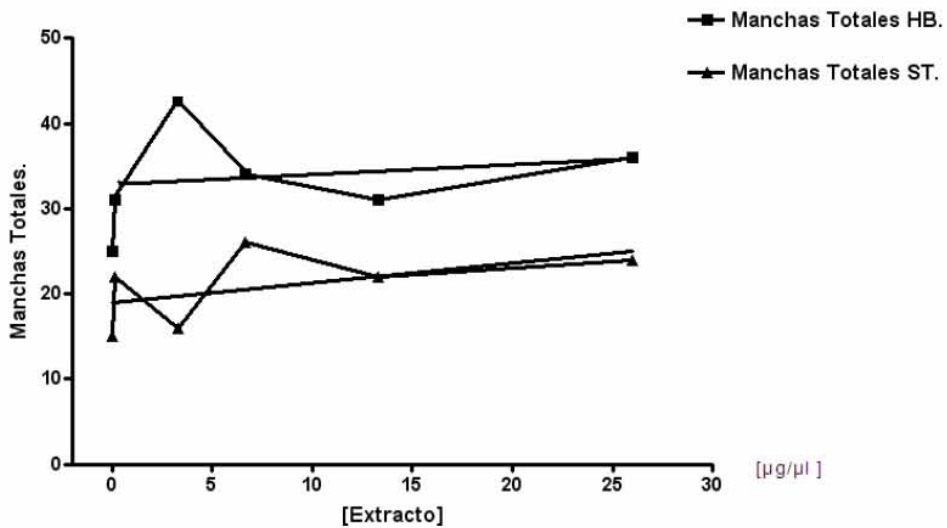
Análisis estadístico de acuerdo a Frei y Wüerler (1988) En el cual: += positivo; - = negativo; i= indeterminado; d+0 débil positivo; m= factor de multiplicación. Nivel de probabilidad:  $\alpha=\beta=0.05$  (prueba estadística de una sola cola).



Gráfica 3. Frecuencia de manchas totales inducidas por el extracto acuoso de *Malmea depressa* en la cruz de alta bioactivación (HB), el cual muestra un patrón asintótico.



**Gráfica 4. Cruza de alta Bioactivación. En ella se muestra el número y el tamaño de manchas simples obtenidas durante el tratamiento agudo (6hrs).**



**Gráfica 5. Frecuencia de manchas totales inducidas por el extracto acuoso de *Malmea depressa* en ambas cruza (HB y ST), la cual muestra mediante la regresión lineal que no existe una relación entre la cantidad de compuesto y el número de manchas.**

## 14. Discusión

México es uno de los cuatro países megadiversos ya que posee alrededor de 30,000 especies de plantas, de las cuales se sabe que cerca del 10% son utilizadas por la medicina tradicional( [www.semarnat.gob.mx](http://www.semarnat.gob.mx) ), este aspecto es de suma importancia ya que el censo poblacional más reciente de nuestro país registro alrededor de 103.5 millones de habitantes([www.inegi.gob.mx](http://www.inegi.gob.mx)). De acuerdo con Meckes (1993) el 80% de la población mundial y específicamente en países en desarrollo utilizan plantas medicinales como alternativa, puesto que es mucho más barata y fácil de conseguir, además de ser muy eficiente y efectiva para tratar diversos padecimientos (Meckes, 1993).

A pesar de la enorme diversidad de plantas que existen en nuestro país y aun cuando es conocido que en general las plantas tienen un gran potencial para la producción de sustancias mutagénicas y carcinógenas, como antimutagénicas, sólo un pequeño porcentaje de especies han sido estudiadas química y farmacológicamente (Ebadi, 2000).

*Malmea depressa* es una de las plantas que han sido reportadas por la medicina tradicional para el tratamiento de la diabetes mellitus II, ésta ha probado ser muy efectiva para mantener los niveles de azúcar en sangre de manera controlada (Andrade *et al.*, 2005).

En la actualidad existen muy pocos trabajos sobre *Malmea depressa* reportados en la literatura, siendo este trabajo el primer estudio sobre los efectos tóxicos y genotóxicos, por lo cual el conocimiento de los compuestos químicos que posee esta planta hasta hace poco tiempo no se conocía.

Estudios reportados por Andrade y sus colaboradores (2005), confirmaron la presencia de dos derivados del fenol, que se piensa pueden ser flavonoides: 2-Hidroxi-3,4,5-trimetoxi-1-(2', 4'-hidroxi-3'-dihidroxi) butil-benceno y 2-Hidroxi-3,4,5-trimetoxi-1 (2',3',4'-hidroxi)butil-benceno. Este hecho es de suma importancia ya que los flavonoides ejercen funciones biológicas indispensables, así como efectos benéficos en el caso de muchas enfermedades como cáncer, enfermedades cardiovasculares y de desórdenes neurodegenerativos. Muchas de estas actividades han sido atribuidas a sus propiedades antioxidantes, ya sea por su propia capacidad reductora o por su posible influencia intracelular, provocando un estado de reducción. El mecanismo preciso mediante el cual los flavonoides ejercen su acción, tanto benéfica como tóxica, aún es desconocida (Rice-Evans, 2001; 1995; Rice-Evans *et al.*, 1996). Sin embargo, estudios recientes proponen que la actividad antioxidante (hidrógeno-donante) es insuficiente para explicar los efectos celulares que se han reportado. Esta afirmación se basa en el hecho de que los flavonoides *in vivo* son metabolizados, dando como resultado una alteración significativa de su potencial de reducción. A pesar de esto, las concentraciones de flavonoides que se encuentran *in vivo* son suficientemente elevadas para tener actividad farmacológica en receptores, enzimas y factores de transcripción. Dentro de esta actividad destaca el número tan grande de proteínas cinasas que han sido reportadas como posibles blancos en los que interactúan directamente los flavonoides (Rice-Evans *et al.*, 2004).

Otro aspecto importante de los flavonoides es el hecho de que han sido reportados también con actividad prooxidante. Algunos estudios reportados indican la mutagenicidad y genotoxicidad de los flavonoides tanto en sistemas

experimentales bacterianos como de mamíferos (Susuki *et al.*, 1991, Carver *et al.*, 1983 y Sahu *et al.*, 1993). Debido a sus características estructurales, estos metabolitos pueden reducir el  $\text{Fe}^{3+}$  y el  $\text{Cu}^{2+}$  para sufrir una auto oxidación o incluso involucrarse en un proceso de cíclico rédox, actuando de esta manera como agentes prooxidantes, lo que explicaría los efectos reportados en la literatura de mutagenicidad y genotoxicidad. Los estudios presentados ponen en evidencia que los flavonoides pueden comportarse como antioxidantes y prooxidantes, e influyen en ellos factores tales como las condiciones del ensayo, la concentración efectiva que se alcanza en el sitio donde la especie reactiva del oxígeno es formada, así como la estabilidad del radical del flavonoide formado al donar un átomo de hidrógeno al radical atacante. Por tal motivo, aun cuando se asegura que los flavonoides están libres de toxicidad y efectos secundarios (genotoxicidad y mutagenicidad), lo que permite su amplio uso terapéutico, es necesario profundizar en los efectos secundarios que puedan producir (Pérez-Trueba, 2003).

Hoy en día para que un compuesto químico o un medicamento se pueda ofrecer al público, es necesario someterlo a diversas pruebas que determinen su toxicidad, genotoxicidad, carcinogenicidad, mutagénesis y teratogénesis. Uno de los ensayos que ha probado ser muy eficiente en la detección de compuestos que son capaces de inducir recombinación mitótica así como mutaciones puntuales, es el ensayo de mutación y recombinación somáticas (SMART) versión ala , el cuál en el caso particular de este trabajo se utilizó para probar el efecto genotóxico de *M. depressa*. Este ensayo es muy versátil y efectivo para probar tanto mezclas complejas como simples, siendo utilizado desde casi 2 décadas sobre colorantes, aditivos para los alimentos, bebidas,

medicamentos, plantas, insecticidas o para probar niveles de contaminación en agua (Romero-Jiménez *et al.*, 2005; Souza do Amaral *et al.*, 2005). Además, los resultados sobre la evaluación de algún compuesto o fitomedicamento pueden ser obtenidos en pocas semanas puesto que se requiere una sola generación, siendo un sistema *in vivo* que puede estimar mutaciones y recombinaciones mitóticas, permitiendo exponer un gran número de células somáticas al agente en cuestión.

En el caso de SMART versión *ala*, es importante destacar que se utilizaron dos cepas distintas: la de alta bioactivación (HB) y la estándar (ST). La diferencia fundamental entre ambas cruza recae en el hecho de que la primera presenta una sobreexpresión constitutiva de citocromos P450, en específico de la subfamilia CYP6A2, la cuál es similar a las subfamilias CYP3A Y CYP3A16 de los seres humanos y del ratón respectivamente, mientras que la segunda (ST) presenta niveles basales de estas enzimas (Saner *et al.*, 1996; Itoh *et al.*, 1994).

Cabe mencionar que en el presente trabajo no se observó una diferencia significativa entre las series tratadas y los testigos concurrentes, lo cual indicó que los principios activos del extracto de *Malmea depressa* no requieren ser metabolizados, ni se requiere una mayor expresión de enzimas para activarlos. Los resultados obtenidos pueden ser comparados con los diversos trabajos que se han realizado con plantas medicinales reportados en la literatura.

Existe un trabajo reciente sobre el análisis de seis plantas utilizadas en la medicina tradicional (*Matricaria chamomilla*, *Tilia cordata*, *Mentha piperita*, *Mentha pulegium*, *Uncaria tomentosa* y *Valeriana officinalis*), en el cual se utilizó, al igual que en el presente trabajo, la prueba SMART para determinar la

posible genotoxicidad o antigenotoxicidad de cada una de las plantas (Romero-Jiménez *et al.*, 2005), utilizando solo la cruza estándar (ST). Los resultados obtenidos en este ensayo fueron similares a los obtenidos en la cruza estándar tratada con *M. depressa*.

En ambos casos las frecuencias obtenidas no son significativas estadísticamente entre las series tratadas y los testigos concurrentes.

Por otro lado, Dutra-Pimenta y Nepomuceno (2004) del Instituto de Genética y Bioquímica de Brasil encontraron un efecto genotóxico en *Plantago major*, la cual es utilizada por la medicina tradicional para el tratamiento de enfermedades parasitarias. En este trabajo se utilizaron tanto la cruza estándar (ST) como la de bioactivación elevada (HB), mostrando en éste caso un aumento significativo en las frecuencias de las series tratadas con respecto al testigo negativo

También se ha probado que ciertas plantas pueden ejercer un efecto protector ante algunos compuestos genotóxicos. Idaomar y sus colaboradores (2001), encontraron que algunos aceites esenciales de plantas como *Helichrysum italicum*, *Ledum groenlandicum* y *Ravensara aromatica*, fueron probados en conjunto ante uretano, presentando un efecto protector, ya que se observan frecuencias menores a los testigos concurrentes (control negativo) ante los efectos inducidos por dicho genotóxico.

En este estudio no se detectó ningún efecto genotóxico en el extracto fitoterapéutico de *Malmea depressa* en ninguna de las dos cruza utilizadas, ya que la frecuencia de manchas inducidas por el extracto no presentó un aumento estadísticamente significativo entre las series tratadas y el control negativo, lo cual indica que los compuestos presentes en la mezcla del extracto

de la raíz no son capaces de producir daño, ya sea por que no hay un compuesto genotóxico presente en la mezcla o que esté presente alguno en muy baja cantidad y no ser capaz de inducir daño o bien, que los compuestos estén actuando de manera sinérgica e interactúen inhibiendo por medio de un antagonista al compuesto genotóxico. Es evidente que es muy difícil conocer el modo de acción de los extractos de las plantas, puesto que contienen un gran número de sustancias diferentes, aunado al hecho de que no sabemos como están interactuando unas con otras.



## 15. Conclusión.

- El extracto fitoterapéutico de *Malmea depressa* no mostró ser genotóxico tanto en la cruza estándar como en la cruza de alta bioactivación, en las células somáticas de las alas de *Drosophila melanogaster* bajo las condiciones probadas, por tal motivo no se pudo determinar su mecanismo de acción, presentando además una respuesta similar en ambas cruzas.
- Se recomienda probar el extracto de *Malmea depressa* en un tratamiento crónico, puesto que éste representaría mejor la forma en la cual es usado por la medicina tradicional.

## 16. Bibliografía:

- \*Aguilar, A.1994. Herbario medicinal del Instituto Mexicano del Seguro Social. 1a ed. IMSS, México. 253p.
- \*Aguilar,A y Xolapa,M 2002. La herbolaria mexicana en el tratamiento de la diabetes. Ciencia, vol.53,núm.3. 24-35p.
- \* Akerele, O (1993) Nature's medicinalbounty: don't throw it away. World Health Organization, Geneva, Switzerland. 390-395p.
- \*Andrade, A.,Wiedenfeld H., Revilla M.C. e Islas S. 2000. Hypoglycemic effect of *Equisetum myriochaetum* aerial part on streptozotocin diabetic rats. J. Ethnopharmacol. 72: 129-133p.
- \*Andrade, A. y Wiedenfeld, H 2001.Hipoglycemic effect of *Cecropia Obtusifolia* on streptozotocin diabetic rats. J. Ethnopharmacol. 145-149p.
- \* Andrade, A. y Heinrich, M 2005. Mexican plants with hypoglycaemic effect used in the treatment of diabetes. J. Ethnopharmacol. 325-348p.
- \*Andrade, A. Martinez, E. Wiedenfeld, H. 2005. Hipoglycemic effect of *Malmea depressa* root on streptozotocin diadetic rats. J. Ethnopharmacol. 319-22p.
- \*Argueta, A. 1994. Atlas de las plantas de la medicina tradicional mexicana tradicional. INI, México. p 706.
- \*Carver JH, Carrano AV, MacGregor JT. 1983. Genetics effects of the flavonols quercetin, kaempferol, and galangin on chinese hamster ovary cells in vitro. Mutat Res; 113:45-60.
- \*Demerc, M. y Kaufmann B.P.1962. Introducción a la Genética y Citología de *Drosophila melanogaster*. Trad. Biol. Rodolfo Félix Estrada, Comisión Nacional de Energía Nuclear, Programa de Genetica. 45-47p.
- \*Dueñas. I 2002. Efecto Mutagénico y Recombinogénico de la P-FENILGENEDIAMINA y la O-FENILENEDIAMINA, Mediante la Prueba de Mutación Somática en las Alas de *Drosophila melanogaster*. Facultad de Ciencias. Tesis de Maestria.
- \*do Amaral, VS; da Silva, RM; Reguly, ML; de Andrade, HHR. 2005. *Drosophila* wing-spot test for genotoxic assessment of pollutants in water samples from urban and industrial origin. Mutat. Res.-Genet. Toxicol. Environ. Mutag. Vol. 583, no. 1, pp. 67-74.

\*Dutra- Pimenta, V. y Nepomuceno, J. 2005. Genotoxicity *Testing of Plantago major* Extracts in Somatic Cells of *Drosophila melanogaster*. Environmental and Molecular Mutagenesis. 56-61p.

\* Ebadi, M 2000. Pharmacodynamic Basis of Herbal Medicine. CRC PRESS. New York. pp 726.

\*Fernández-Mejía, C. 1996 Biología Molecular de la Diabetes Mellitus. Revista de Endocrinología y Nutrición. pp 55-62.

\*Frei H. y Würgler F.E.(1988) Statistical methods to decide whether mutagenicity test data from *Drosophila* assays indicate a positive, negative, or inconclusive result. Mutation Research, 203 (1988) 297-308.

\*García- Bellido A. y J.R. Merriam 1974. Parameters of wing imaginal disc development of *Drosophila melanogaster*. Develop. Biol. 24, 61-87.

\*Gómez-Pompa, A 1993 Las raices de la etnobotánica mexicana, Universidad de California Riverside. Instituto de Ecología A,C. y Sociedad Botánica de México. pp 26-37.

\*Graf, U., Wurgler, F. Katz, A., Frei, H., Juon, H., Hall, C y Kale, P 1984 Somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. Environ. Mutag. 6, 153-188p.

\* Graf, U., Frei, H., Kägi, A., Katz, A.J. y Würgler, F.E. 1989 Thirty compounds tested in *Drosophila melanogaster* wing spot test. Mutat. Res., 222, 359-373p.

\*Graf, U y van Schaik, N. 1992 Improved high bioactivation cross for the wing somatic mutation an recombination test in *Drosophila melanogaster*. Mutation Res. 271, 59-67p.

\*Graf, U 1995 Analysis of the relationship between age of larvae at mutagen treatment and frequency and size of spots in the wing somatic mutation an recombination test of *Drosophila melanogaster*. Experientia. 168-173p.

\*Graf, U., Spanó, M.A., Guzmán - Rincon, J., Abraham, S.K.y Andrade,H.H 1996 The wing Somatic Mutation and Recombination Test (SMART) in *Drosophila melanogaster*: An efficient tool for the detection of genotoxic activity of genotoxic activity of pure compounds and complex mixtures as well as for studies on antigenotoxicity. Second Conference of Pan -African Environmental Mutagen Society (PAEMS). 23-25 Jan.1996, African Newsletter on Occupational Health and Safety..

\*Guzmán- Rincón, J y Graf, U 1995 *Drosophila melanogaster* somatic mutation and recombination test. Biomonitoring and Biomarkers of Environmental Change. Plenum Press, New York. pp 169-181.

\*Heinrich, M., Ankli, A., Frei. B., Weimann. C. y Stichrt. O. (1998) Medicinal Plants in México: Healers' Consensus and Cultural Importante. Institute of

Pharmaceutical Biology, Schänzlestrasse. Soc. Sci. Med. Vol 47 N° 11. pp 1859-1871.

\*Idaomar, M; El Hamss, R; Bakkali, F; Mezzoug, N, Zhiri, A; Baudoux, D; Muñoz-Serrano, A; Liemanz, V; Alonso-Moraga, A 2001 Genotoxicity and antigenotoxicity of some essential oils evaluated by wing spot test of *Drosophila melanogaster*. Mutation Reserch. 61-68p.

\*Islas, A.S y Revilla; M.C 1999. Diabetes mellitus: concepto y una nueva clasificación en Diabetes mellitus. Islas, A:S y Lifshitz, G:A (Eds) 2 ed. Mac Graw-Hill Interamericana. México, pp.3-14.

\* Itoh, S; Satoh, M ; Abe, Y;Hashimoto, H; Yanagimoto, T; Kamataki, T 1994. A novel form of mouse cytochromr-P450 3 (cyp 3-16). Its cDNA cloning and expression in fetal liver. Eur. J. Biocem. 226, 877-882.

\*Jiménez A. y Mata R 1996. Phyto-grow-Inhibitory Compunds from *Malmea depressa*, American Chemical Society and American Society of Pharmacognosy. pp 253-260.

\*Kong J, M., Gon N,K., Chia L, S., Chia T,F 2003. Recent advances in traditional plant drugs and orchids. Acta Pharmacol. Sin 24(1), -21.

\*Kufer, J. Forther, H. Poll, E. Heinrich, M 2005. Historical and Modern medicinal plant uses—the example of the Ch'orti Maya and Ladinos in Eastern Guatemala. J. Ethnopharmacol. 88 (2005) 119-124.

\*Lars W. 1997. Studies in annonaceae. XXVIII.macromorphological variation of recent invaders in northern central america: the case of *Malmea* (annonaceae). American Journal of Botany 84(6): 861–869.

\*Martínez. E 2004. Efecto hipoglucemiante de *Malmea depressa* (Baillon)R:E Fries. Facultad de Ciencias. Tesis de Licenciatura.

\*Meckes, M. 1993 Introducción en: Investigación Científica de la Herbolaria Medicinal Mexicana Secretaria de Salud México. IMSS. Edición Conmemorativa. México D.F. pp 71-75

\*Nelson, D y Cox, M 2001 Lehninger Principios de Bioquímica, Tercera edición. Editorial OMEGA. 1152p.

\*Oesch, F and Arand, M 1993. Xenobiotic Metabolism. Institute of Toxicology, University of Mainz, Germany.

\*Pearson, M.J 1974 The abdominal epidermis of *Calliphora erythrcephala* (Diptera). Polyteny and growth in the larval cell. J. Cell. Sci.16, 113-131.

\*Pérez-Trueba G. 2003. Los flavonoides: Antioxidantes o Prooxidantes. Rev Cubana Invest Biomed: 22 (1): 48-57.

- \*Rice- Evans, C. 1995 Plant polyphenols: free radical scavengers or Caín-breaking antioxidants? *Biochem. Soc. Symp.* 61:103-116
- \*Rice- Evans, C. A.; Miller, N. J.; Paganga, G. 1996 Structure-antioxidant activity relationship of flavonoides and phenolic acids. *Free Radic. Biol Med.* 20: 933-956.
- \*Rice- Evans, C. 2001 Flavonoid antioxidants. *Curr. Med. Chem.* 8: 797-807.
- \*Rice- Evans, C. Robert J. Jeremy P. E. Spencer. 2004 Flavonoids: antioxidants or signaling molecules?. *Free Radic. Biol Med.* 7: 838-849.
- \*Rodriguez-Arnaiz, R 1994. Las Toxinas Ambientales y sus Efectos Genéticos. La ciencia para todos. FCE, México. pp (9 – 93).
- \*Rodriguez-Arnaiz, R 2003. *Drosophila* como organismo en la Biología Experimental en la Célula. L. F. Jiménez y H. Merchant (Eds) Editorial Pearson Education (Addison-Wesley-Prentice Hall). pp761-791.
- \*Rodriguez-Arnaiz, R. 2004. Metabolismo de las Toxinas Ambientales. La ciencia para todos. FCE, México. p (7-103).
- \*Romero-Jiménez, M. Campos Sánchez, J. Analla, M. Muñoz-Serrano, A. Alonso-Moraga, A. 2005. Genotoxicity and anti-genotoxicity of some traditional medicinal herbs. *Mutation Reserch.* 585: 147-155.
- \*Russell, P. 1998. *Genetics.* The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc. Fifth Edition U.S.A., pp 805.
- \*Sahu SC, Gray GC. 1993. Interactions of flavonoids, trace metals, and oxygen: nuclear DNA damage and lipid peroxidation in induced by miricetin. *Cancer Lett;* 70:73-9.
- \*Saner, C, Weibel, B, F.E. y Sengstag, C 1996. Metabolismo f promutagenes catalyzed by *Drosophila melanogaster* CYP6A2 enzyme in *Sacharomyces cerevisiae*. *Environ. Mol. Mutagen.* pp 27, 46-58.
- \*Susuki S, Takada T, Sugawara Y. 1991. Quercetin induces recombinational mutations in cultured cells as detected by DNA fingerprinting. *Japan J Cancer Res* ;82:1061-4.
- \* Vogel, E. W 1991. Genotoxic chemicals. An introduction into basic principles of genetic toxicology. Apuntes del Primer Taller Latinoamericano en Genética Toxicológica en *Drosophila melanogaster*. Tlaxcala, Méx.

**Direcciones electrónicas consultadas:**

- \* [www.citocromos.com/ induccio.html](http://www.citocromos.com/induccio.html)
- \* [www.cdi.gob.mx](http://www.cdi.gob.mx)
- \* [www.conabio.gob.mx](http://www.conabio.gob.mx)
- \* [www.fkkt.org](http://www.fkkt.org)
- \* [www.gesundheit.de/.../ niere/niere-im-fokus/](http://www.gesundheit.de/.../niere/niere-im-fokus/)
- \* [www.omega.ilce.edu.mx](http://www.omega.ilce.edu.mx)
- \* [www.mobot.com](http://www.mobot.com)
- \* [www.ssm.gob.mx](http://www.ssm.gob.mx)