



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

Valoración del efecto genotóxico
de *Monarda austromontana* Epling en células somáticas
de *Drosophila melanogaster*

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G A

P R E S E N T A :

LUCÍA ANGÉLICA MÉNDEZ GARCÍA



DIRECTOR DE TESIS:

DRA. ROSARIO RODRÍGUEZ ARNAIZ

2009



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.

1. Datos del alumno Autor.	1. Datos del alumno.
Apellido paterno: Apellido materno: Nombre(s): Teléfono: Universidad: Facultad: Carrera: Numero de Cuenta:	Méndez García Lucía Angélica 55 36 58 91 57 UNAM Ciencias Biología 40609837-1
2. Datos del asesor:	2. Datos del asesor
Grado Nombre (s) Apellido paterno Apellido materno	Dra. Rosario Rodríguez Arnaiz
3. Datos del sinodal 1	3. Datos del sinodal 1
Grado Nombre(s) Apellido paterno Apellido materno	Dr. Jesús Javier Espinosa Aguirre
4. Datos del sinodal 2	4. Datos del sinodal 2
Grado Nombre(s) Apellido paterno Apellido materno	Dra. Nelly Diego Pérez
5. Datos del sinodal 3	5. Datos del sinodal 3
Grado Nombre(s) Apellido paterno Apellido materno	Dra. América Nitxin Castañeda Sortibrán
6. Datos del sinodal 4	6. Datos del sinodal 4
Grado Nombre(s) Apellido paterno Apellido materno	Quim. de Alim. Verónica Muñoz Ocotero
7. Datos de la tesis:	
Título:	Valoración del efecto genotóxico de <i>Monarda austromontana</i> Epling en células somáticas de <i>Drosophila melanogaster</i>
Subtítulo:	-----
No. de páginas:	48 pp.
Año:	2009

Agradecimientos:

Al personal del Laboratorio de Genética de la Facultad de Ciencias, UNAM, en especial con todo mi respeto y admiración a la Dra. Rosario Rodríguez Arnaiz quién dirigió este trabajo y contribuyó enormemente a mi formación. A la Dra. América Castañeda Sortibrán por su apoyo incondicional y a la M. en C. Guadalupe Ordaz Téllez por su ayuda y amistad.

A todas las personas que de alguna manera contribuyeron para la realización de este trabajo, gracias a la M. en C. Edelmira Linares y al Dr. Robert Bye por coleccionar y proporcionar la planta utilizada en la investigación, a la Q.A. Verónica Muñoz por su ayuda en la realización de las cromatografías en capa fina (Vero por tu paciencia y amistad gracias) y al M. en C. Ramón Silva que sin conocerme me ayudó en la realización de la cromatografía de gases (de Chihuahua tenía que ser!).

Como no mencionar a las personas que me hicieron sentir como en casa, a mis grandes amigos: Rafa, Juan Carlos, Carlos, Tania, Jime, Saida, Vero, Alfonso, Josué, Gabo, Silvio, Kbto, espero que no se me pase nadie!

A la familia Pineda Enríquez por que me hicieron sentir como parte de ella, mil gracias a mis padres adoptivos Miguel y Lolita.

Gracias Leo por todo tu apoyo y cariño, por estar siempre a mi lado.

A mi familia, a mi hermana y amiga Grisel por ser mi ejemplo a seguir y por supuesto a ti mamá que simplemente no tengo palabras para agradecerte todo lo que has hecho por nosotras, sin tu respaldo esto jamás se habría realizado, este trabajo esta dedicado para ti con todo mi amor.

“No temáis a la grandeza; algunos nacen grandes, algunos logran grandeza, a algunos la grandeza les es impuesta y a otros la grandeza les queda grande”
(William Shakespeare 1564-1616)

Índice

1. Resumen	1
2. Introducción.....	2
2.1 Historia de la medicina tradicional	2
2.2 Toxicología	4
2.3 Toxicología genética.....	5
2.4 <i>Monarda austromontana</i> Epling.....	6
2.5 Clasificación.....	7
3. <i>Drosophila melanogaster</i> como sistema de prueba	9
3.1 Ciclo de vida de <i>Drosophila melanogaster</i>	9
3.2 Prueba de recombinación y mutación somática	11
4. Justificación.....	13
5. Objetivos	13
6. Hipótesis.....	14
7. Materiales y métodos	14
7.1 Obtención de la planta.....	14
7.2 Preparación del extracto acuoso y concentraciones utilizadas.....	14
7.3 Análisis químico por Cromatografía en Capa Fina (CCF).....	15
7.4 Análisis químico por Cromatografía de Gases (CG).....	16
7.5 Material biológico: cruza utilizada	17
7.6 Prueba de toxicidad	18
7.7 Prueba de mutación y recombinación somática (SMART).....	18
7.8 Obtención y análisis de las alas.....	20
8. Análisis estadístico.....	25
9. Resultados	27
9.1 Resultados del análisis químico en Cromatografía en Capa Fina (CCF)	27
9.2 Resultados del análisis químico en Cromatografía de Gases.....	28
9.3 Resultados de la toxicidad	29
9.4 Resultados del Bioensayo SMART	30
10. Discusión.....	35
11. Conclusiones.....	42
12. Bibliografía.....	43

1. Resumen

Monarda austromontana Epling (Lamiaceae) es una planta que se distribuye principalmente en el Norte de México y en el Sur de Estados Unidos. Es conocida como orégano de Chihuahua, orégano del burro o napá, es utilizada en la medicina tradicional para aliviar diversos padecimientos como dolor de garganta, resfriado y problemas gastrointestinales, además se emplea como condimento en platillos como el pozole (Bye, 1986). Debido a que no existen estudios sobre su posible toxicidad y genotoxicidad se evaluaron estos parámetros mediante el ensayo de mutación somática y recombinación mitótica (SMART, Somatic, Mutation and Recombination Test). Este ensayo se basa en la detección de diversos puntos genéticos terminales, tales como, la pérdida de la heterocigosis que puede ser ocasionada por: mutación puntual, recombinación mitótica, deleción y eventos de no disyunción, estas alteraciones se observan en la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster* como manchas o clones en las alas. Se emplean dos marcadores que alteran el fenotipo de los tricomas de las alas: pelos múltiples en las alas (*mwh*) y flama (*flr*). Si un compuesto químico resulta ser genotóxico causará la pérdida del alelo silvestre opuesto a la mutación marcadora, con la subsecuente expresión del alelo recesivo, formando un clon cuyo fenotipo se expresa como una mancha en las alas del adulto de *Drosophila melanogaster* (Graf et al. 1984). Este trabajo se dividió en tres etapas: primero con larvas de tercer estadio de *Drosophila melanogaster* se evaluó la toxicidad de diferentes concentraciones de extractos acuosos (infusiones al 1, 5 y 10% y una decocción al 10%) preparados con *Monarda austromontana* Epling, una vez determinadas las concentraciones no tóxicas para *D. melanogaster* se realizó la prueba de mutación somática y recombinación mitótica (SMART) para valorar el efecto genotóxico de los extractos y por último se analizaron los grupos químicos de metabolitos secundarios que componen a la planta.

Los resultados de este trabajo muestran que las diferentes concentraciones de los extractos acuosos de *Monarda austromontana* Epling no muestran efectos tóxicos ni genotóxicos en las condiciones de este ensayo in vivo. Los análisis químicos revelan la presencia de un considerable número de terpenos, principalmente triterpenos y monoterpenos como carvacrol y timol.

2. Introducción

2.1 Historia de la medicina tradicional

Durante generaciones, y a través de miles de años, los hombres de diferentes épocas y de todas las culturas han encontrado en las plantas un importante recurso para el alivio del dolor y de las enfermedades, posiblemente debido a la cercanía del hombre con el mundo vegetal. En respuesta a su necesidad primaria de alimento y, mediante el método de ensayo y error el hombre aprendió que muchas de ellas podían tener otras utilidades como la de curar o paliar algún padecimiento, e incluso la dosis o la manera de preparación podían ser la diferencia entre la curación o la muerte del que las consumía. Los curanderos transmitieron estos conocimientos (y aún lo siguen haciendo) a sus descendientes a través de muchas generaciones de manera oral, al tiempo que dejaba constancia de las plantas que le eran útiles o perjudiciales mediante su representación en dibujos y pinturas, también las esculpió sobre rocas, les asignó nombres que escribió junto con la manera de emplearlas sobre tabletas de arcilla cocidas, sobre bambú, papiro, corteza de árbol, en pedazos de seda o en pieles curtidas de animales (Waizel, 2006).

Los griegos y los romanos fueron de las primeras civilizaciones que se interesaron en el estudio de las plantas medicinales. Hipócrates, quién vivió en el siglo V a. C. es considerado el padre de la medicina, en sus obras menciona alrededor de 300 a 400 plantas con indicaciones para el tratamiento de heridas mediante la aplicación de hierbas curativas. Teofrasto (372-287 a. C.), médico y botánico griego, conocido como el padre de la botánica describió más de 500 especies de plantas incluyendo su aplicación medicinal. Por su parte Dioscórides, también médico griego, escribió *De materia médica*, una de las primeras farmacopeas sistemáticas, la que incluía 600 especies de vegetales. Plinio “el viejo” (24-79 d.C.), naturista romano, recogió su monumental obra de 37 volúmenes *Historia Mundi o Historia Naturalis*, de los cuales en 13 se trata de diversas plantas utilizadas como medicina. Dicha obra la tradujo del latín al castellano, Francisco Hernández en el siglo XVI, después de diez años de ardua labor. Hernández es considerado el primer protomédico de las Indias, historiador del rey Felipe II de España (Waizel, 2006).

En el México precolombino, el grupo étnico de los aztecas tenía un amplio conocimiento en relación al uso de la herbolaria, del cual se enteraron los reyes de España mediante las *Cartas de relación* que enviaba Hernán Cortés durante la conquista, por lo que Felipe II decidió enviar a su médico personal Francisco Hernández a hacer un estudio de la materia, de modo que pudo estudiar más de 2 mil plantas medicinales. De México y América arribaron a Sevilla los barcos procedentes de las Indias cargados de productos vegetales que todos los médicos europeos esperaban para probarlos y así aumentar su arsenal terapéutico (Barquín, 1984). Los mayas encuentran también en las plantas y en los animales de sus regiones recursos para la curación y el alivio de sus padecimientos (Waizel, 2006).

La ciencia en Egipto era fundamentalmente de tipo práctica como lo muestran los papiros descubiertos, entre los que sobresalen los de Ebers y Smith. En el Ebers se mencionan recetas que incluyen plantas para el tratamiento de diversas enfermedades. Esta sabiduría egipcia se sigue utilizando hasta nuestros días (Waizel, 2006).

En otras civilizaciones, como la China, las plantas medicinales gozan de gran reputación, se sabe que son muy numerosas, alrededor de 20 mil especies, aunque a la fecha se han catalogado más de 5 mil especies de hierbas medicinales; algunas de ellas se dice que son más eficaces que algunos medicamentos occidentales (Wen, 1979).

En nuestros tiempos y en opinión de la Organización Mundial de la Salud, (1985) el 80% de los más de 4 mil millones de habitantes en el planeta de ese entonces, utilizaban y acudían todavía, a las medicinas tradicionales de sus países para la atención de problemas primarios de la salud (Waizel, 2006). Un examen entre los estados miembros de la Unión Europea, identificó alrededor de mil 400 medicamentos herbolarios usados en la Comunidad Económica Europea (WHO, 1996).

México es considerado un país megadiverso, se calcula que existen alrededor de 20 mil especies de plantas vasculares con un gran número de endemismos que se encuentran fundamentalmente en los matorrales xerófilos

de las zonas áridas y semiáridas (Rzedowsky, 1994). México dispone aún de más de cuatro mil vegetales con posibilidad de resolver algunos problemas primarios de salud, plantas que sólo conocen y utilizan unos cuantos compatriotas y que hace falta validar o estudiar a la luz de los conocimientos científicos de la actualidad y con el apoyo de la tecnología moderna y de disciplinas relacionadas, para que puedan convertirse en fármacos modernos de utilidad para todo el género humano, o al menos que esos conocimientos fitoterapéuticos tradicionales se pongan al alcance de un mayor número de personas, mediante la realización de estudios etnobotánico-médicos o de etnofarmacología tradicional (Waizel, 2006).

2.2 Toxicología

El seguimiento de los efectos de sustancias tóxicas (venenos) es una actividad que el ser humano ha desarrollado durante toda su historia. El origen de la toxicología moderna puede rastrearse desde Mateo Emanuel Orfila, quien en 1815 publica su obra fundacional *“Tratado de los venenos de los reinos Mineral, Vegetal y Animal”*, cuya primera parte la dedica al estudio de los efectos nocivos de los productos químicos en organismos. Este trabajo discute muchos aspectos de la toxicología que aún son válidos. Incluye las relaciones entre la presencia de un compuesto químico en el cuerpo y los síntomas observados de envenenamiento, mecanismos por los cuales, los venenos son eliminados del cuerpo. Desde entonces, la toxicología se ha desarrollado a un ritmo acelerado, gracias al impulso de otras disciplinas como son: los avances de la biología, la química y las ciencias bioquímicas. Entre estos avances se encuentran las técnicas de análisis químicos y sus instrumentos modernos que proveen los medios para medir los venenos químicos y sus metabolitos en muy bajos niveles y con gran sensibilidad (Manahan, 2003).

2.3 Toxicología genética

La toxicología genética es una rama de la toxicología que estudia y caracteriza a los agentes químicos y físicos capaces de interactuar con el material genético de los organismos vivos. Los toxicólogos genéticos han desarrollado y validado alrededor de 200 bioensayos tanto *in vivo* como *in vitro* capaces de detectar a aquellos agentes que inducen diversos puntos genéticos terminales (Li y Heflich, 1991). La toxicología genética evolucionó a partir de los estudios pioneros sobre la mutabilidad de los genes demostrada primero por Müller en 1927 con rayos X, y 20 años después por Auerbach y col. (1947) con el gas mostaza. Ambos investigadores condujeron sus estudios usando a la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster*. En los siguientes veinte años, los cambios genéticos en animales, inducidos por radiación y por compuestos químicos fueron demostrados por Cattanaach (1966) y Russell (1951), estos trabajos aportaron un mayor conocimiento sobre las causas de algunas enfermedades hereditarias atribuyendo su origen a factores ambientales no considerados por otros estudios de la época (Li y Heflich, 1991).

La toxicología genética fue reconocida como disciplina en 1969 cuando el Dr. Alexander Hollaender fundó la Sociedad de Mutágenos Ambientales (EMS, por sus siglas en inglés Environmental Mutagen Society), los integrantes de esta sociedad se concentraron en tratar de detectar el potencial del impacto genético en los seres humanos asociado con la proliferación de agentes químicos presentes en el ambiente generados por la actividad humana. De esta forma el concepto de toxicología genética, mantenido hasta nuestros días, muestra la intensa preocupación hacia la protección ambiental y al patrimonio genético (Brusick, 1987).

Simultáneamente con la creciente preocupación de los genetistas sobre los agentes mutagénicos ambientales varios grupos de investigadores mostraron una relación entre la carcinogénesis y la mutagénesis. El resultado de estas investigaciones fue la identificación de genes involucrados en el proceso carcinogénico en mamíferos (oncogenes), (Ames, 1979; Sugimura, 1976).

Uno de los objetivos de la toxicología genética es la implementación de métodos de evaluación del riesgo que implica el impacto de los agentes genotóxicos encontrados en el ambiente y cuya presencia puede alterar la integridad del acervo genético humano. Otro objetivo es llevar a cabo metodologías de ensayos genéticos que permitan la detección y el conocimiento de los mecanismos de acción de los compuestos químicos ambientales. La toxicología genética ha sido aplicada para el monitoreo de carcinógenos potenciales (Brusick, 1987).

Un compuesto puede ser definido como genotóxico si produce una respuesta positiva (mutación, síntesis del DNA no programada o rompimiento de cromosomas) en un bioensayo midiendo cualquier punto genético terminal. Estos compuestos químicos capaces de inducir alteraciones genéticas están presentes en el ambiente, estamos en contacto constante con ellos y se pueden encontrar en lo que comemos o en lo que respiramos (Brusick, 1987).

2.4 *Monarda austromontana* Epling

Monarda austromontana Epling (Lamiaceae) es una planta vascular que se distribuye en el norte y centro de México en los estados de Chihuahua, Durango, Sinaloa, Sonora y Michoacán, así como en el centro y sureste de Estados Unidos en estados como Nuevo México y Arizona (Fig. 1), (Phytochemical and ethonobotanical Databases)¹. Esta planta es conocida bajo el nombre de orégano de Chihuahua, orégano del burro o del conejo (Aguilar *et al.*, 1994)². Entre los tarahumaras se denomina napá y es tradicionalmente una planta con alto valor medicinal (Bye, 1986), sus tallos y hojas son preparados en forma de té (“agua de uso”), solos o en mezclas para dolores de garganta y resfriados. El cocimiento de las hojas se utiliza para el tratamiento de la tos y de manera cutánea para raspones y heridas (Aguilar *et al.*, 1994)². Para enfermedades gastrointestinales se sumergen las semillas en agua fría dejándolas reposar, tomando el líquido hasta tres veces al día (Moreno-Salazar *et al.*, 2008).

¹ Disponible en: <http://www.ars-grin.gov/duke>

² Disponible en: <http://www.publicaciones.ipn.mx/PDF/1490.pdf>

Además se utiliza como saborizante de comida, preparándose mediante la trituración en seco empleando las manos y espolvoreándola sobre los alimentos.

Los extractos acuosos y metanólicos, inhiben de forma moderada el crecimiento de la bacteria *Helicobacter pylori*, asociada a la gastritis crónica y a úlceras peptídicas (Castillo-Juárez *et al.*, 2009)

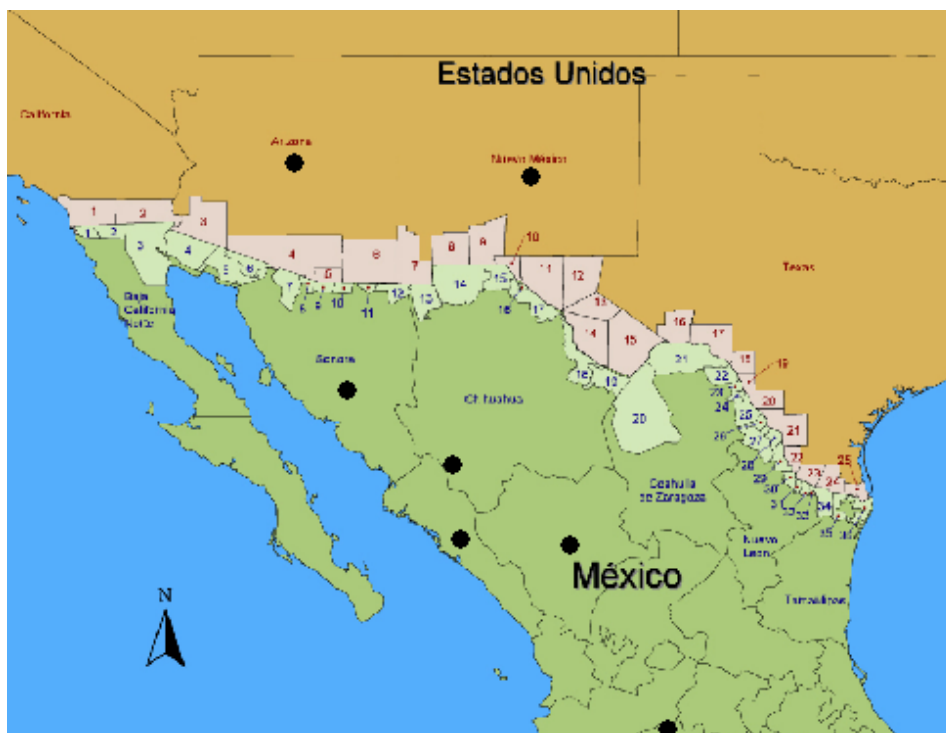


Fig. 1. Distribución geográfica de *Monarda austromontana* Epling; principalmente se encuentra en el Norte de México y Sur de estados Unidos (modificado de Plants Database³).

2.5 Clasificación

Monarda austromontana Epling pertenece a la familia Lamiaceae, algunos autores la posicionan dentro de la familia Labiatae debido a que es el nombre conservado de la familia Lamiaceae (GRIN Taxonomy for plants)⁴. Es un arbusto siempre verde (Fig. 2) y durante el verano toma una coloración violeta (Gardening.eu)⁵.

³ Disponible en: <http://plants.usda.gov/java/profile?symbol=MOCIA>

⁴ Disponible en: <http://www.ars-grin.gov/cgi-bin/npgs/html/taxon.pl?312136>

⁵ Disponible en: <http://es.gardening.eu/arc/plantas/Arbustos/Monarda-austromontana-Epling/45368/>

Su clasificación es la siguiente:

Superreino: Eukaryota

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Orden: Lamiales

Familia: Lamiaceae

Subfamilia: Nepetoideae

Tribu: Mentheae

Género: *Monarda*

Especie: *Monarda austromontana* Epling

Sinonimia: *Monarda citriodora* Cerv. ex Lag. var. *austromontana* (Epling) B. L. Turner



Fig. 2. Morfología de *Monarda austromontana* Epling (tomado de Henriette Kress⁶).

⁶ Disponible en: <http://www.henriettesherbal.com>

3. *Drosophila melanogaster* como sistema de prueba

Drosophila melanogaster fue elegida como modelo biológico en 1909 por T. H. Morgan. Muchos de los principios en genética fueron establecidos mediante el estudio de este organismo, incluyendo la teoría cromosómica de la herencia, el mapeo genético, los alelos múltiples, la no disyunción y sus consecuencias, el comportamiento genético de las aberraciones cromosómicas, la mutagenicidad de la radiación ionizante, y el descubrimiento de compuestos químicos mutagénicos (Ashburner, 1989).

Drosophila melanogaster es un organismo que al ser utilizado como sistema de prueba presenta principalmente dos ventajas: permite su cultivo en espacios reducidos por ser un organismo pequeño y se pueden obtener varias generaciones en poco tiempo dado que su ciclo de vida es de aproximadamente 10 días. El hecho de que *Drosophila* sea un eucarionte holometábolo permite realizar los experimentos con el organismo intacto, es decir, *in vivo*. El número cromosómico de *Drosophila* es relativamente pequeño y está totalmente mapeado (Rodríguez-Arnaiz, 2003). Es un excelente modelo para la Toxicología Genética ya que presenta un metabolismo endógeno para la biotransformación de xenobióticos, el cual es comparable al metabolismo hepático de mamíferos (Graf *et al.*, 1986).

3.1 Ciclo de vida de *Drosophila melanogaster*

El ciclo de vida de este organismo en condiciones óptimas de temperatura y humedad (25°C y 60% de humedad relativa) se completa en 10 días. Las larvas eclosionan después de 22 a 24 horas e inmediatamente después comienzan a alimentarse: Hay tres etapas larvarias: L1 y L2 que duran 24 horas cada una y L3 con duración de 48 horas. Durante la etapa L1 la larva se alimenta en la superficie del medio, comienza a excavar llegada la etapa L2, y continúa alimentándose inmersa en el medio dejando expuestos solo sus espiráculos posteriores (Sokal *et al.*, 1960). El pH del medio de cultivo cambia considerablemente, así como también su microflora conforme avanza el desarrollo larvario (Gordon y Sang, 1941). La alimentación continúa por 110

horas después de la oviposición. Después de que cesa la alimentación, la larva entra a una etapa de recorrido dejando la comida en búsqueda de un sitio adecuado para la pupación (formación del puparium), este es el periodo crítico para la pupa que se encuentra en ausencia de comida por aproximadamente 70 horas, la cual ocurre a las 120 horas después de la oviposición. El periodo de pupación a la eclosión es de aproximadamente 4 - 4.5 días. La pupación es el proceso que incluye el acortamiento del cuerpo, la eversión de los espiráculos posteriores y el endurecimiento de la piel de la larva que ocurre dentro de la tercera etapa larvaria. El puparium formado por este proceso es suave y blanco encierra al animal ahora inmóvil hasta que este eclosiona como un adulto. Dentro de las siguientes 4-6 horas de la pupación ocurre la apólisis larva-pupa, apólisis es el término que se le da a la retracción de la epidermis de la cutícula vieja perteneciente a la tercera etapa larvaria, la apólisis se caracteriza por una burbuja de gas en el abdomen del animal (Jenkin y Hinton, 1966). Entre la pupación y la apólisis es correcto denominarla prepupa y después de la apólisis es técnicamente una pupa, aunque algunos autores solo usan éste término para describir al animal después de la eversión de la cabeza (Ashburner, 1989), ésta etapa sólo dura 24 horas antes de que la ecdisis de pupa a adulto ocurra (Poodry y Schneiderman, 1970).

Las moscas adultas emergen con las alas plegadas y con cuerpos largos, delgados y relativamente sin pigmentación. La extensión de las alas ocurre dentro de la primera hora después de la eclosión y la pigmentación se completa dentro de las 2 a 3 horas (Fig. 3). Las hembras se vuelven receptivas después de 12 a 14 horas, permanecen en este estado al menos una semana, pero su receptividad va decreciendo. Después de su apareamiento, las hembras depositan sus huevos en la superficie de la comida, con el micrópilo y el apéndice coriónico expuestos al aire. Las hembras pueden ovipositar alrededor de 100 huevos por día (Ashburner, 1989). Aunque las hembras no apareadas también pueden ovipositar, la forma de hacerlo es enteramente diferente a la forma conocida de ovipositar de una hembra apareada (Boulétrèau-Merle 1971).

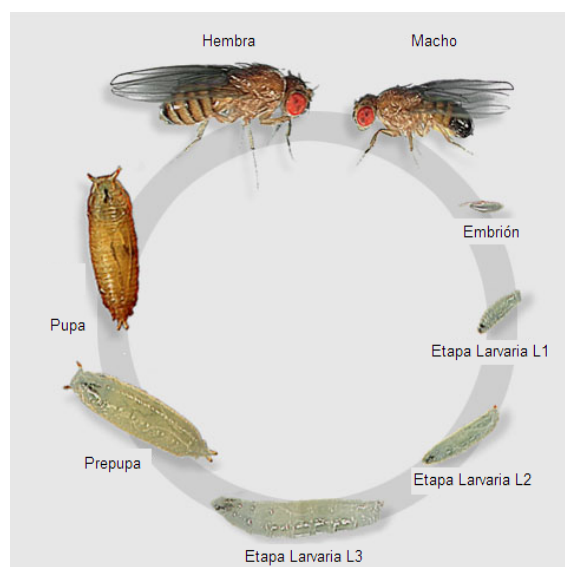


Fig. 3. Ciclo de vida de *Drosophila melanogaster* (modificado de FlyMove¹)

3.2 Prueba de recombinación y mutación somática

El ensayo *in vivo* de mutación y recombinación somática en las alas de *Drosophila melanogaster* (SMART), fue desarrollado por Graf *et al.*, (1984) y en el presente trabajo ha sido seleccionado en esta investigación para evaluar la genotoxicidad de *Monarda austromontana* Epling ya que el bioensayo presenta

varias ventajas entre ellas: en una sola generación es posible obtener resultados, evalúa tanto la inducción de mutaciones específicas como de recombinaciones mitóticas y las células analizadas alcanzan los valores cercanos a 25,000 por ala (Graf *et al.*, 1984). Esta prueba se basa en detectar mutación somática y recombinación mitótica en el brazo izquierdo del cromosoma tres en células somáticas de los discos imaginales de larvas de *Drosophila melanogaster* (Fig. 4). Las células somáticas de las larvas de tercer estadio son puestas al contacto con el extracto, a partir de ello, tienen tres rondas de división celular, si algún compuesto químico resulta ser genotóxico causará pérdida de heterocigosis (LOH por sus siglas en inglés loss of heterozygosity), es decir, la pérdida del alelo silvestre opuesto al gen marcador, con la subsecuente expresión del alelo marcador recesivo; estas alteraciones son provocadas por la acción de varios mecanismos como pérdidas de cromosomas, deleciones, mutaciones puntuales y recombinación mitótica. Si se producen estas modificaciones en las células blanco, éstas las heredan a la

¹ Disponible en: http://www.anatomy.unimelb.edu.au/researchlabs/whittington/img/life_cycle.jpg

siguiente generación celular formando un clon cuyo fenotipo se expresa durante la metamorfosis como una mancha en las alas del adulto de *Drosophila melanogaster* (Graf *et al.*, 1984).

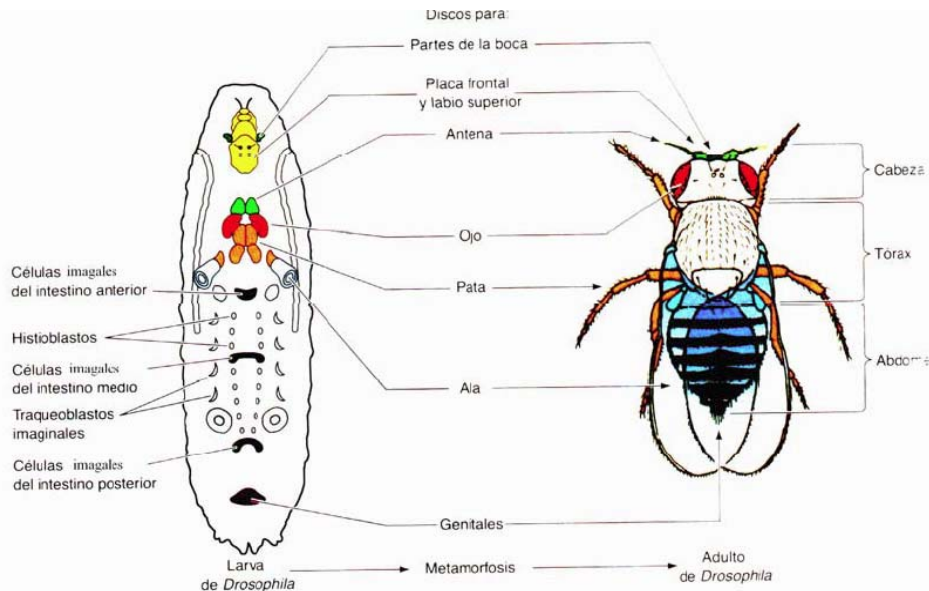


Figura 1. Localización de los discos imaginales y estructuras a las que darán lugar en el adulto de *Drosophila melanogaster* (Tomado de Gilbert, 2003).

El ensayo SMART se ha empleado para la evaluación de un amplio número de compuestos químicos tanto de agentes individuales como el trabajo realizado por Yesilada, 2001 con metales pesados, como con mezclas complejas de partículas encontradas en filtros instalados para rastrear la calidad del aire en la ciudad de México (Delgado-Rodríguez *et al.*, 1999). Con la prueba SMART se ha mostrado la actividad genotóxica de herbicidas utilizados en el cultivo de gramíneas como el trigo (Heres *et al.*, 2008) y en el control de la maleza (Fragiorge *et al.*, 2008). Se han evaluado algunos fármacos utilizados en tratamientos contra enfermedades de importancia médica como la leucemia mieloide (Silva *et al.*, 2002) así como también la evaluación de algunos antidepresivos (van Schaik y Graf, 1991).

Recientemente se ha valorado la actividad genotóxica de otras plantas utilizadas en la medicina tradicional como *Cecropia obtusifolia* Bertol planta que se emplea como remedio contra la diabetes mellitus tipo II (Martínez-Toledo *et al.*, 2008) y *Equisetum myriochaetum* planta que también se utiliza en remedios contra la diabetes mellitus tipo II y problemas de riñones (Ordaz-Tellez *et al.*, 2007).

Igualmente se han llevado a cabo estudios basados en la prueba SMART con plantas que poseen propiedades tales como la actividad antimutágena y antirecombinogénica de semillas de la uva *Vitis vinifera* L, que contienen protoantocianidinas (Alves *et al.*, 2009), del mismo modo se ha evaluado el efecto co-recombinogénico de la vainillina (VA) encontrada en la vaina del frijol (Hertzog *et al.*, 1999).

4. Justificación

Entre la sociedad mexicana se utiliza de manera tradicional un gran número de plantas para diferentes finalidades como alimento, medicina y ornato (Bye *et al.*, 1995). Estas plantas pueden tener un uso en particular o inclusive varios, como es el caso de *Monarda austromontana* Epling que es utilizada en la medicina tradicional y de manera cotidiana como condimento. Estas prácticas medicinales y culinarias, aportan a la planta relevancia económica y la hacen interesante para evaluar algún posible efecto genotóxico asociado a su consumo. Debido a que no hay reportes en la literatura acerca de los efectos colaterales que provoca el uso de esta planta ni de la composición química de la misma, se realizaron pruebas de toxicidad y genotoxicidad así como análisis químicos para determinar algunos grupos químicos de metabolitos secundarios presentes en *Monarda austromontana* Epling

5. Objetivos:

Objetivo General:

Conocer si los extractos acuosos de la planta *M. austromontana* Epling presentan o no un efecto genotóxico bajo las condiciones del bioensayo *in vivo* de mutación y recombinación somática en ala de *Drosophila melanogaster* (SMART).

Objetivos Particulares:

Determinar la toxicidad de los extractos acuosos de la planta.

Identificar algunos grupos de metabolitos secundarios que presenta *M. austromontana* Epling.

6. Hipótesis:

Ho: La frecuencia de manchas en las series tratadas con extractos acuosos de *Monarda austromontana* Epling no será estadísticamente distinta a la frecuencia de manchas obtenidas del testigo, por lo tanto no se considera que los componentes de los extractos produzcan un efecto genotóxico.

Ha: La frecuencia de manchas en las series tratadas con extractos acuosos de *Monarda austromontana* Epling será estadísticamente mayor a la frecuencia de manchas obtenidas del testigo, por lo tanto se considera que los componentes de los extractos presentan un efecto genotóxico.

7. Materiales y métodos

7.1 Obtención de la planta

La planta utilizada en este estudio fue colectada en el Municipio de Urique Chihuahua el 15 de Octubre del 2008, el ejemplar fue depositado en el Herbario Nacional de México (MEXU) de la Universidad Autónoma de México, con número de colecta: Robert Bye 35145 y Edelmira Linares.

7.2 Preparación del extracto acuoso y concentraciones utilizadas

Para que las plantas mantengan la efectividad que muestran al ser utilizadas como medicina de complemento, es importante saber cómo se preparan. Debido a que la planta es consumida tradicionalmente en extractos acuosos se utilizaron infusiones al 1, 5 y 10% y una decocción al 10%, la cantidad de planta triturada a utilizar se determinó a partir de la cantidad de planta que contiene un té comercial que es de 1 gramo.

En el caso de la infusión se usaron 100 mL de agua potable, se añadieron 10g de la planta triturada, se dejó calentar hasta que aparecieron las primeras burbujas de ebullición, se retiró del fuego, se tapó y se dejó reposar por espacio de 10 a 15 minutos, obteniendo una infusión con concentración al 10%.

A partir de la infusión al 10% se realizaron diluciones para obtener infusiones al 5% y 1%. La infusión 5% se obtuvo mediante la dilución de 6mL de infusión 10% en 6mL de agua, obteniendo 12mL de infusión al 5%. La infusión 1% fue producto de la dilución de 1mL de infusión al 10% en 9mL de agua.

Para preparar una decocción la mezcla se deja hervir por espacio de 30 minutos cuando es un litro del preparado. En este caso la decocción al 10% se realizó con 20mL de agua y 2g de la planta se puso a hervir durante 36seg, el tiempo fue calculado mediante una regla de tres en donde un litro de agua (1000mL) se deja hervir 30min (1800seg), por lo tanto para 20mL se requiere de un tiempo de 36seg. Se tapó, se dejó enfriar y se filtró para servir en tubos con tapa. Sólo se utilizó la decocción al 10%.

7.3 Análisis químico por Cromatografía en Capa Fina (CCF)

En colaboración con el laboratorio de Química de la Facultad de Ciencias, UNAM, a cargo de la Dra. María Cristina Pérez Amador Barrón, se realizó un análisis químico cualitativo de la planta *Monarda austromontana* Epling. El estudio fue hecho por un método de extracción conocido como maceración, se trituraron 40g de la planta y se pusieron en contacto con aproximadamente 200mL del disolvente, se empleó hexano, acetato de etilo y metanol de manera secuencial, estos disolventes van de menor a mayor polaridad. La primera maceración se hizo con hexano, se dejó por 48 horas, se filtró y el filtrado se destiló a presión reducida con un rotavapor (BÜCHI), obteniendo el extracto concentrado y almacenándolo en un vial. La destilación y la maceración se repitieron 4 veces. Antes de macerar con el siguiente disolvente se dejó secar la planta extraída para seguir el procedimiento anterior con el acetato de etilo y posteriormente con el metanol.

Una vez obtenidos los extractos de hexano, acetato de etilo y metanol, se hicieron pruebas de solubilidad a cada uno y posteriormente se procedió a su análisis cromatográfico. Se empleó la cromatografía en capa fina (CCF), usando como fase estacionaria sílicagel 60F₂₅₄, para determinar la fase móvil con que se separarían de la mejor manera estas muestras se probaron diferentes mezclas de disolventes, encontrándose para el extracto de hexano que la fase móvil ideal es hexano: acetato (90:10), para el extracto del acetato de etilo hexano: acetato (50:50) y para el extracto de metanol butanol: ácido acético: agua (6:0.5:3).

Ya determinados los elementos para la realización de la cromatografía, se cortó una placa para cada extracto, aplicando 1.5mg de la muestra respectiva por carril, siete en total, se eluyeron con las fases móviles determinadas para cada extracto, y al término de la corrida se retiró la placa de la cámara y se dejó evaporar la fase móvil. Las placas se revelaron por métodos físicos (luz visible y rayos ultravioleta 254 nm y 365 nm) y químicos (reveladores específicos). Se dejó el primer carril como control, a los carriles posteriores se les aplicaron reveladores específicos en el siguiente orden: cloruro de aluminio (AlCl₃) que detecta flavonoides, cloruro férrico (FeCl₃) que

revela fenoles, permanganato de potasio (KMnO_4) que localiza compuestos de carbonos insaturados, revelador Draggendorff que detecta alcaloides, el revelador de Lieberman específico para terpenos (triterpenos) y en el último carril se aplicó sulfato cérico, el cual revela la mayoría de la materia orgánica presente en el carril. Se determinó el factor de retención (R_f) de las bandas encontradas por cada revelador.

7.4 Análisis químico por Cromatografía de Gases (CG)

En colaboración con el Centro de Investigación de Recursos Naturales (CIReNa), ubicado en Salaces, López en el estado de Chihuahua, a cargo del M.en C. Ramón Silva Vázquez se realizó un análisis de cromatografía de gases para detectar compuestos monoterpénicos. El orégano analizado fue *Monarda austromontana* Epling cuyo numero de colecta es Robert Bye 35145 y Edelmira Linares (MEXU), mismo que se utilizó para las pruebas toxicológicas, genotoxicológicas y análisis químico cualitativo en cromatografía en capa fina. Para la extracción del aceite esencial se llevo 1 gramo de la planta a la estufa de secado a una temperatura de 65°C durante 72 horas. Posteriormente se limpió manualmente para eliminar impurezas. Se realizó la extracción del aceite siguiendo la metodología establecida por Silva (2005). El aceite fue extraído del orégano mediante hidrodestilación con un prototipo de laboratorio diseñado para este proceso. Dicho proceso consiste en la generación de vapor con un matraz que simula una caldera, dicho vapor pasa a través de otro matraz donde se encuentra depositado el orégano, luego el vapor arrastra el aceite esencial depositado en la planta, que después es condensado en un serpentín y posteriormente separado por densidad en un embudo de separación.

Para la caracterización del aceite esencial se utilizó un cromatógrafo de gases (CLARUS 500), marca Perkin Elmer, utilizando helio como gas acarreador, hidrógeno y aire cero. Se utilizó un detector FID con una columna capilar PE-1 de 30×0.25 mm, con un film de espesor de 0.25 mm (DI). Las condiciones de inyección se realizaron a 265°C , con una línea de transferencia de 225°C , en un tiempo total de 30 minutos. Se cuantificó el contenido de cinco monoterpenos en el aceite: carvacrol, timol, p-cimeno, gamma-terpineno y eucaliptol.

7.5 Material biológico: cruza utilizada

Se utilizó la cruza estándar de *Drosophila melanogaster*, en la cual las moscas portan marcadores en el brazo izquierdo del cromosoma tres y son recesivos: hembras $flr^3 / In (3LR) TM3, ri p^p sep bx^{34e} e^s$ Ser cruzadas con machos mwh / mwh .

Las moscas con genotipo flr^3 ($flare^3$, 3 - 38.8), el cual es letal en condición homocigótica, presentan un fenotipo *Ser* (*Serrate*) que se encuentra en el cromosoma balanceador TM3, y se expresa en forma de muescas en el borde del ala. La condición homocigótica de *Ser* también es letal, por lo que los organismos con este genotipo mueren, quedando sólo los portadores de flr^3 y el cromosoma balanceador. Los cromosomas balanceadores comparten tres propiedades: tienen múltiples inversiones con el fin de suprimir la recombinación entre los cromosomas homólogos, son usualmente letales, provocan esterilidad o exhiben baja viabilidad en condición homocigótica y están marcados a una distancia tal que su presencia en heterocigotos es reconocida con una combinación de alelos mutantes dominantes y recesivos. El aspecto más importante de los balanceadores es su habilidad de suprimir la recombinación (Lindsley y Zimm, 1992). El marcador *mwh* (multiple wing hair 3 - 0.0) se expresa en condición homocigótica con dos a siete pelos por célula, donde normalmente sólo existe uno. (Lindsley y Zimm, 1992).

Los organismos procedentes de esta cruza pueden presentar dos fenotipos diferentes: los transheterocigotos ($mwh + / + flr^3$) que muestran un fenotipo de alas de tipo silvestre y los cisheterocigotos ($mwh + / TM3, Ser$) que llevan el balanceador con el marcador *Ser* y se reconocen por expresar muescas en las alas.

7.6 Prueba de toxicidad

Se sincronizó la cruza antes mencionada, esta recolecta de huevos se realizó por 6 horas en medios adicionados con levadura líquida y seca. Pasadas las 6 horas se retiraron los progenitores y se dejó el material ovipositado. Tres días después, cuando las larvas alcanzaron una edad de 72

$\pm 6h$, se sacaron de los frascos por densidad con una solución de sacarosa al 20%, las larvas se depositaron en cajas petri, donde fueron contadas colocándose 50 larvas por vial de tratamiento. Se prepararon cinco viales con 0.5g de medio instantáneo Carolina (Carolina Biological Supply Company, Burlington, NC) por vial y 2mL de cada una las concentraciones de los extractos a probar, infusiones (10%, 5% y 1%), decocción 10% y agua pura como testigo concurrente. Se taparon los viales con tapones de poliuretano. Se hicieron dos réplicas del experimento.

Pasados 12 días, se contaron las moscas adultas y se separaron por fenotipo y sexo; de modo que se determinó el porcentaje de supervivencia de las 50 larvas en los diferentes tratamientos.

7.7 Prueba de mutación y recombinación somática (SMART)

Para esta prueba se utilizó la cepa estándar de *Drosophila melanogaster* mencionada en el apartado 7.5, los pasos a seguir en esta metodología se pueden observar en la figura 5. La cepa fue sincronizada durante 6h en medio de cultivo, posteriormente se retiraron los progenitores, quedando solo los huevos ovipositados. Después de tres días, cuando las larvas alcanzaron una edad de $72 \pm 6h$, se sacaron de los frascos utilizando una solución de sacarosa al 20% y se pusieron en tratamientos crónicos cuya duración abarcó desde la tercera etapa larvaria hasta la metamorfosis a adulto (Fig. 6). Se colocaron en tubos con 1g de medio instantáneo Carolina y 4mL de cada extracto a probar.

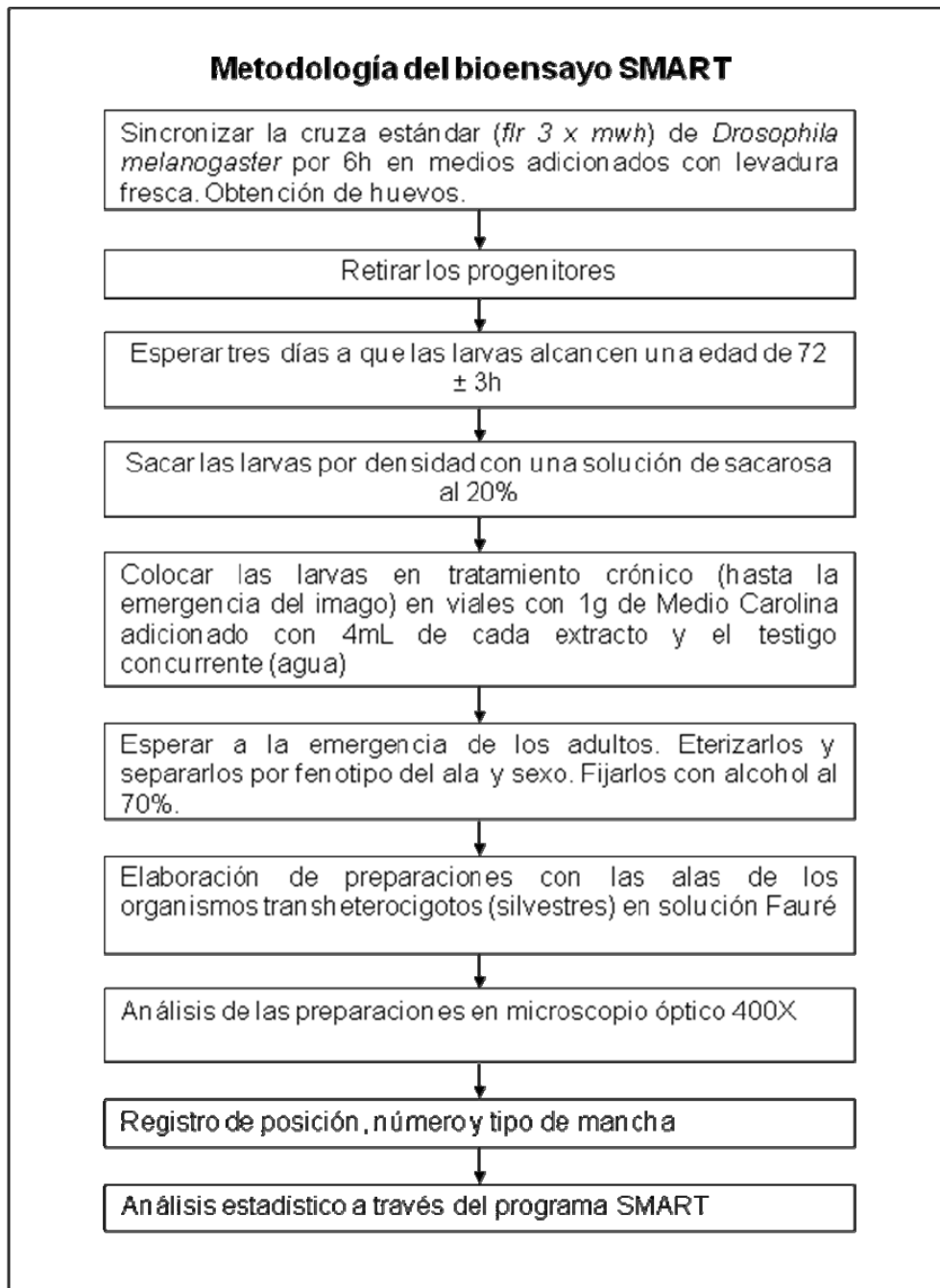


Fig 5. Muestra los pasos a seguir para la realización de la prueba de Mutación Somática y Recombinación Mitótica (SMART).

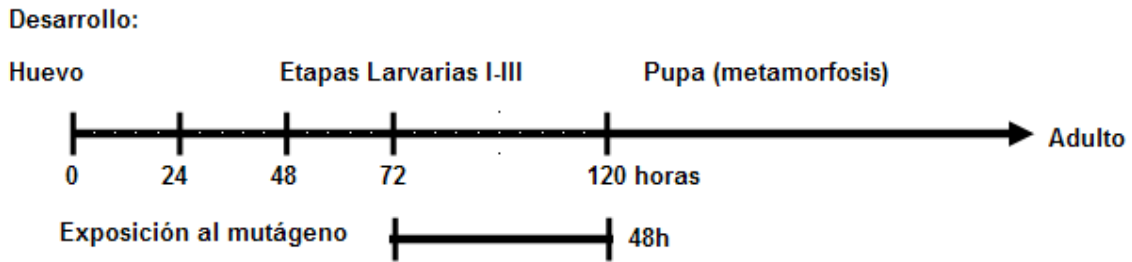


Fig. 6. Tiempo de exposición de larvas transheterocigotas al extracto acuoso de *Monarda austromontana* Epling. La duración de los tratamientos crónicos puede variar de 48 a 96 horas según la etapa larvaria que se utilice. (Modificado de Graf, 1984).

7.8 Obtención y análisis de las alas

Los adultos se separaron por el fenotipo del ala: silvestre (transheterocigotos) y Serrate (cisheterocigotos) y por sexo; se sacrificaron por exceso de éter y se fijaron en alcohol al 70%. Posteriormente se realizaron preparaciones con organismos transheterocigotos, las moscas se embebieron en una gota de solución Fauré (30g de goma arábica, 20ml de glicerol, 50g de hidrato de cloral y 50mL de agua), las alas se separaron del cuerpo con pinzas de relojero y se colocaron en un portaobjetos en parejas, 40 alas por preparación (20 alas de 10 hembras y 20 alas de 10 machos). Se dejó que la preparación se secase durante tres días, después se colocó un cubreobjetos sobre las alas con una gota de Fauré y se procedió a aplicar peso para que las alas se extendieran y se secaran las preparaciones en un tiempo aproximado de dos a tres días; se limpió la preparación y finalmente se selló con esmalte de uñas.

Cada una de las alas fue analizada en un microscopio óptico con aumento 400 X tanto en la superficie dorsal como en la ventral, las alas se han dividido por la presencia de venas en siete zonas: A, B, C', C, D, D' y E (Fig. 7). La posición de la mancha se registró de acuerdo al sector del ala donde se presentó.

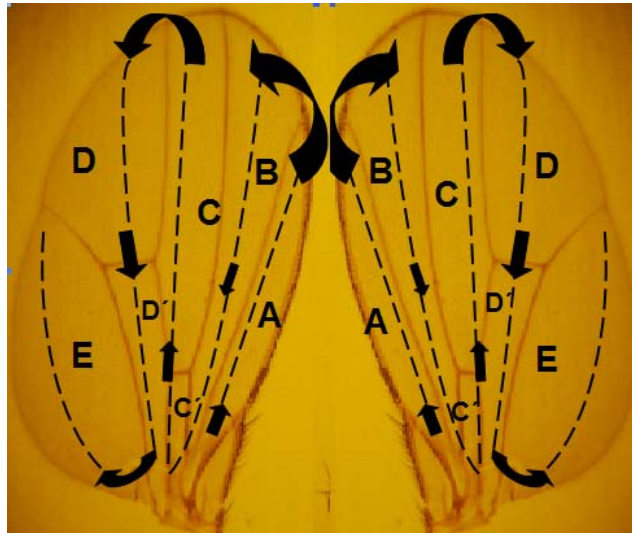


Fig. 7. Posición de las alas en parejas en una preparación y orden de lectura.

Dos tipos de manchas son detectadas: Las manchas simples donde se observan células con dos a siete pelos (*mwh*), que se pueden formar a partir de delección, mutación puntual, recombinación entre los marcadores *flr³* y *mwh* y eventos de no disyunción. Las manchas gemelas en las que se presenta tanto *mwh* como *flr³* son producto de la recombinación del marcador *flr³* y el centrómero (Fig. 8).

Por su tamaño las manchas se clasifican en pequeñas consistiendo en una o dos células afectadas y manchas grandes con tres o más células afectadas. Teóricamente el tamaño de las manchas refleja el número de divisiones celulares que ocurren después de la inducción de cambio genético en un linaje celular (Graf, 1984). Se han encontrado algunos problemas para identificar manchas pequeñas, ya que existen disturbios en el desarrollo del patrón de formación de los tricomas que pueden confundirse con las manchas verdaderas (Fig. 9). También existen células con dos tricomas (fenocopias) y aparecen frecuentemente en la sección D en alas *mwh + / + flr³* y parecen estar formadas por caminos independientes de la mutación *mwh* (Graf, 1984), por ello se han excluido del conteo total de manchas si estas fueron identificadas de manera independiente, no obstante, las fenocopias encontradas dentro de una mancha *mwh* o al margen de ella se incluyeron en la determinación del tamaño del clon.

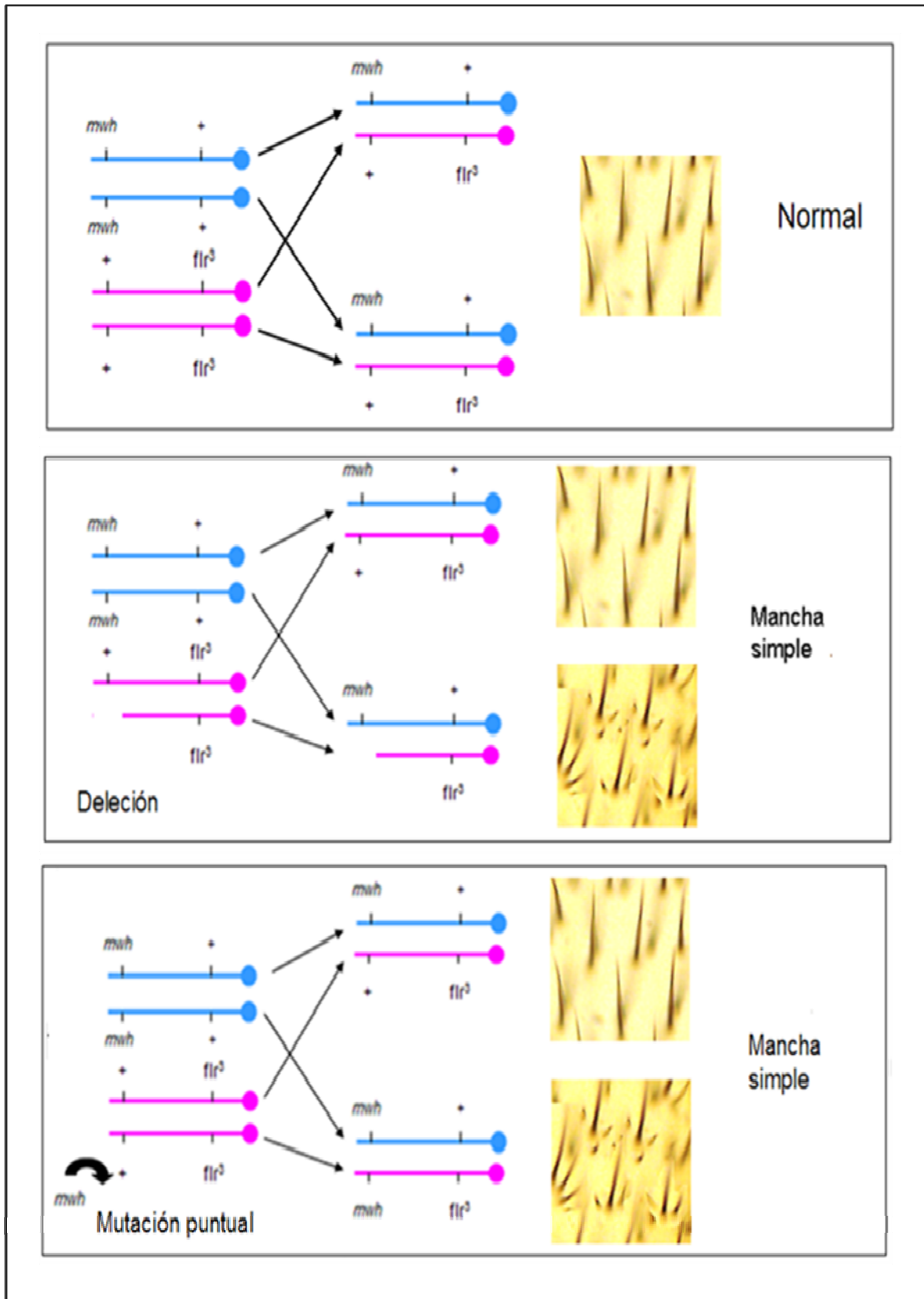
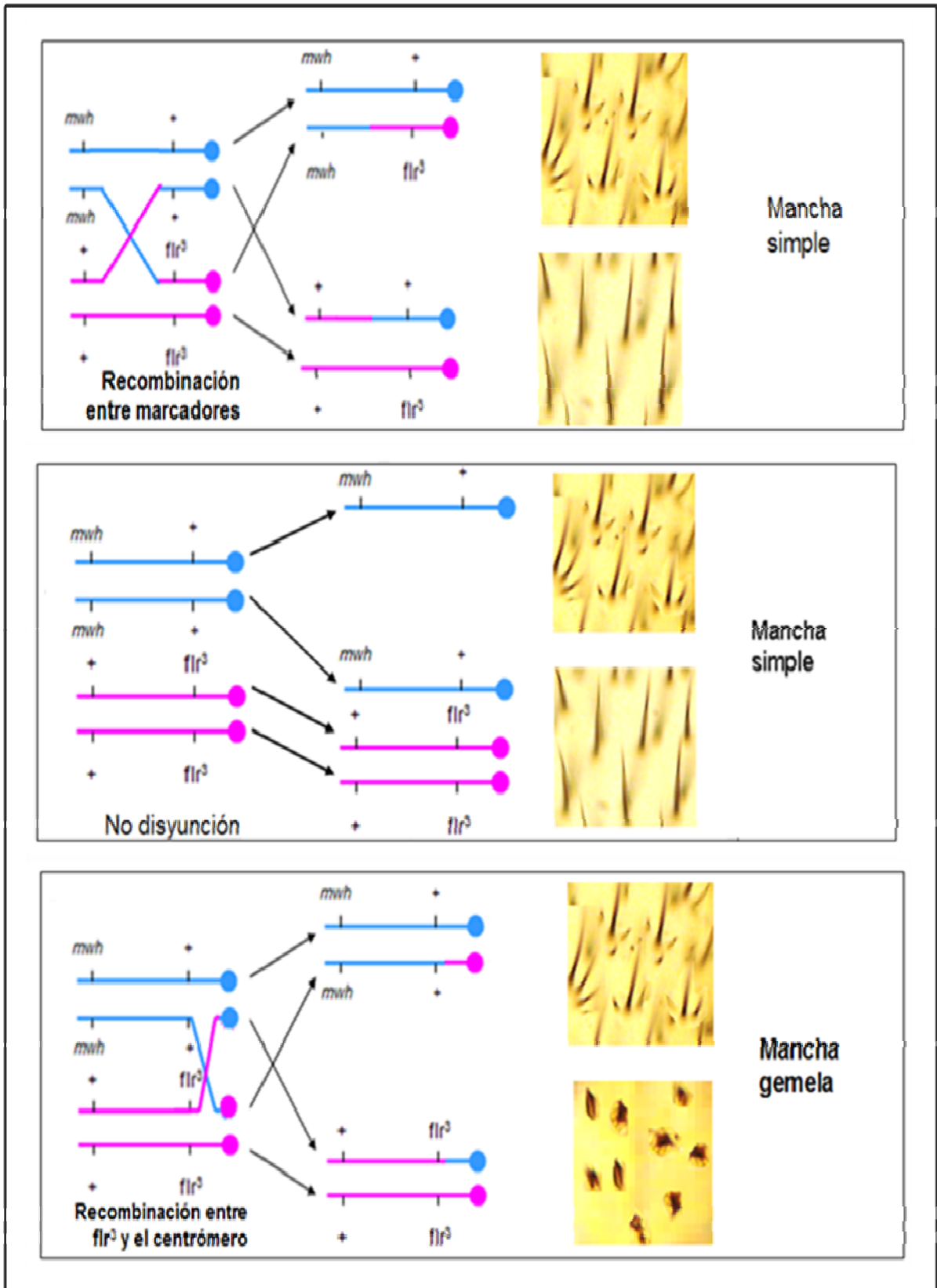


Fig. 8. Eventos genéticos detectados por SMART en alas de *Drosophila melanogaster* (Modificado de Graf, 1984).



Continuación Fig. 8. Eventos genéticos detectados por SMART en alas de *Drosophila melanogaster* (Modificado de Graf, 1984).

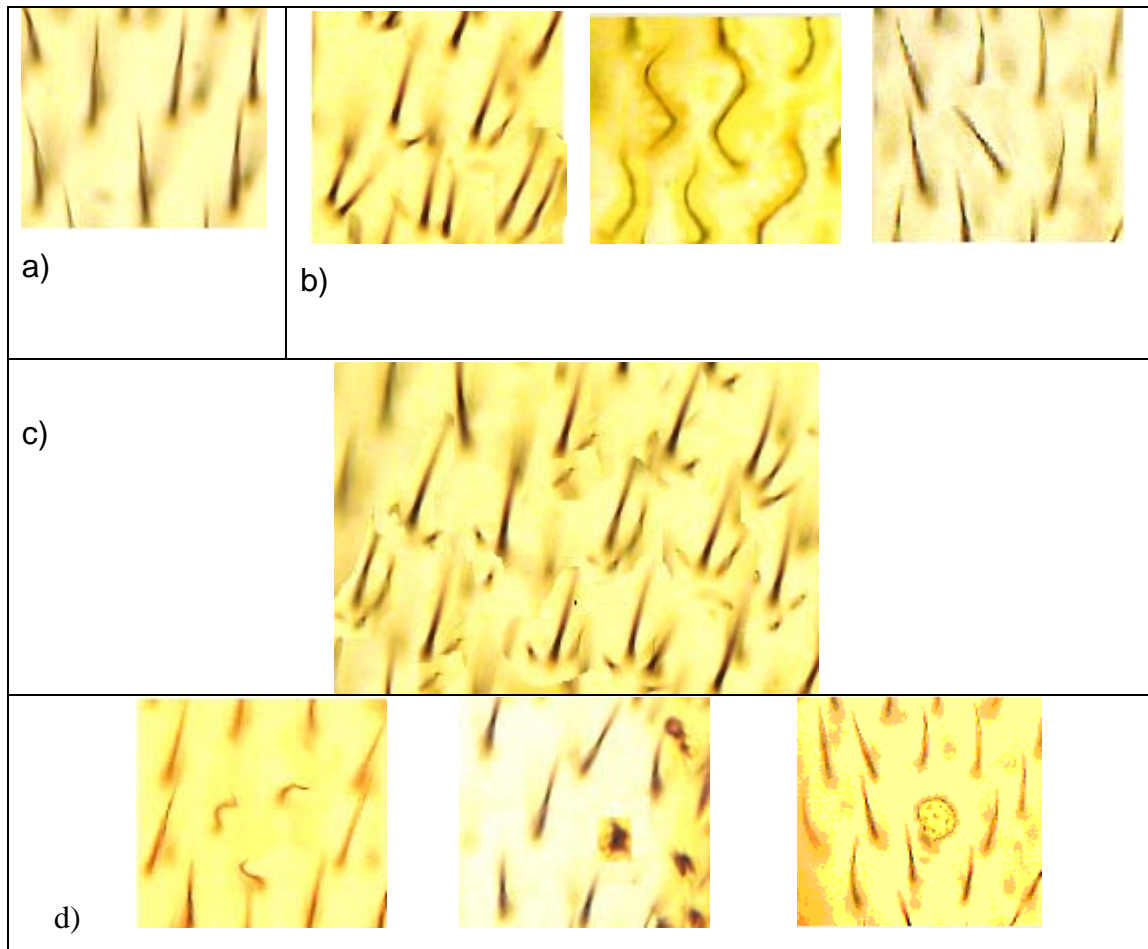


Fig. 9. Tipos de tricomas en una preparación. a) Normal, b) tricomas no contabilizados como *mwh* o *flr³*, c) configuraciones indicadoras de *mwh*, d) manifestaciones típicas de *flr³* (modificado de Graf, 1984).

Las manchas grandes aparecen generalmente como manchas no interrumpidas. Sin embargo algunas veces las manchas se dividen en dos o más grupos de células de diferente tamaño arreglados a lo largo del eje principal de crecimiento, las diferentes divisiones de manchas pueden estar separadas por una o varias rondas de células normales. García-Bellido y Merriam (1971) interpretaron que estos clones son producto de la separación parcial durante el desarrollo debido a la presión interna del tejido o a movimientos celulares independientes. En el presente estudio se contaron como dos manchas independientes a aquellas separadas por tres o más células de tipo silvestre.

8. Análisis estadístico

Se revisaron 120 alas por cada extracto a probar y el testigo concurrente, los datos obtenidos se procesan en el programa de cómputo SMART (Würgler, no publicado) con una $p= 0.05$, que se basa en la comparación de las frecuencias de los tratamientos testigo y experimentales. Este análisis permite conocer si los extractos acuosos de *Monarda austromontana* Epling analizados en este bioensayo tienen un efecto positivo, negativo, débil positivo o inconcluso, considerando dos hipótesis: la hipótesis nula (H_0) estableciendo que la suma de las mutaciones inducidas por el tratamiento no es significativamente mayor a la frecuencia de manchas espontáneas en el testigo concurrente. Por su parte la hipótesis alternativa (H_a) se basa en el factor de multiplicación (m) el cual indica cuanto debe incrementarse el número de eventos de los tratamientos con respecto al testigo para considerar al tratamiento como positivo (Frei y Würgler, 1988). Se utiliza $m=2$ como factor de multiplicación para el total de todas las manchas y para las manchas simples pequeñas (1-2 células) las cuales tienen una incidencia espontánea relativamente alta en el testigo y $m=5$ para las manchas simples grandes así como para las manchas gemelas las cuáles tienen una incidencia espontánea baja (Graf, 1984). Dicho lo cual, la hipótesis alterna puntualiza que la frecuencia inducida es mayor m veces ($m=$ factor de multiplicación) sobre la frecuencia espontánea observada en el testigo concurrente (Frei y Würgler, 1988). En general son posibles cuatro situaciones:

H_0 \ H_a	Se acepta H_a	Se rechaza H_a
Se acepta H_0	Indeterminado (i)	Negativo (-)
Se rechaza H_0	Positivo (+)	Débil positivo (d+)

Fig. 10. Probables resultados en el bioensayo SMART obtenidos por combinaciones de las hipótesis propuestas.

- 1) Resultado inconcluso: aceptar ambas hipótesis, invalidando la opción de que ambas sean verdaderas simultáneamente por lo que no es posible determinar un efecto.
- 2) Resultado negativo: aceptar la hipótesis nula (H_0) y no aceptar la hipótesis alternativa (H_a).
- 3) Resultado positivo: no aceptar la hipótesis nula (H_0) y aceptar la hipótesis alternativa (H_a).
- 4) Resultado débil positivo: no aceptar ninguna hipótesis.

El programa SMART, proporciona además la siguiente información:

- Manchas con clon *mwh*.- Indica cuantos de los clones presentan mutación celular *mwh*.
- Tamaño promedio del clon.- Estima cuantos ciclos de división celular debieron haber pasado para obtener el tamaño promedio de mancha en cada tratamiento.
- La frecuencia de formación de clones $\times 10^{-5}$.- Calcula la inducción de clones en los tratamientos experimentales tomando como referencia los clones en el tratamiento testigo. Es otra manera de evaluar la actividad genotóxica. Una frecuencia de formación de clones mayor a 2.0 indica que el agente químico utilizado es genotóxico. La frecuencia de inducción corregida es la resta del valor del control, por tanto indica la producción de clones debidos al tratamiento.

9. Resultados

9.1 Resultados del análisis químico en Cromatografía en Capa Fina (CCF)

La tabla 1 muestra el rendimiento de la extracción con los tres diferentes disolventes a partir de los 40g de planta triturada empleados en la maceración.

Tabla 1. Rendimiento de extracción con los tres disolventes de menos a mayor polaridad que se utilizaron.

Disolvente	Rendimiento
Hexano	7.12%
Acetato de etilo	2.89%
Metanol	4.05%

De acuerdo al número de bandas encontradas en la cromatografía en capa fina: alta (más de 10 bandas), moderada (menos de 10 más de 5 bandas), baja (menos de 5 bandas). Se puede observar en la tabla 2 que el mayor número de bandas de terpenos se encontraron en el extracto de hexano, mientras que el metanol extrajo la mayor cantidad de flavonoides y fenoles comparado con los otros dos extractos.

Tabla 2. Apreciación de la cantidad de cada metabolito secundario presente en los tres diferentes extractos a partir de disolventes de menor a mayor polaridad

Extracto	Flavonoides	Fenoles	Compuestos insaturados	Alcaloides	Terpenos
Hexano	+	+	+	----	+++
Acetato de Etilo	+	+	+	----	++
Metanol	++	++	+	----	+
+++ Cantidad alta ++ Cantidad moderada + Cantidad baja ---- Grupo no detectado					

9.2 Resultados del análisis químico en Cromatografía de Gases

De los cinco monoterpenos buscados y cuantificados mediante la cromatografía de gases (carvacrol, timol, eucaliptol, gamma-terpineno y p-cimeno), el aceite esencial obtenido de 1g de la planta presentó carvacrol al 58.77%, timol 6.66% y p-cimeno en cantidades apenas detectables (Fig. 11 y Tabla 3).

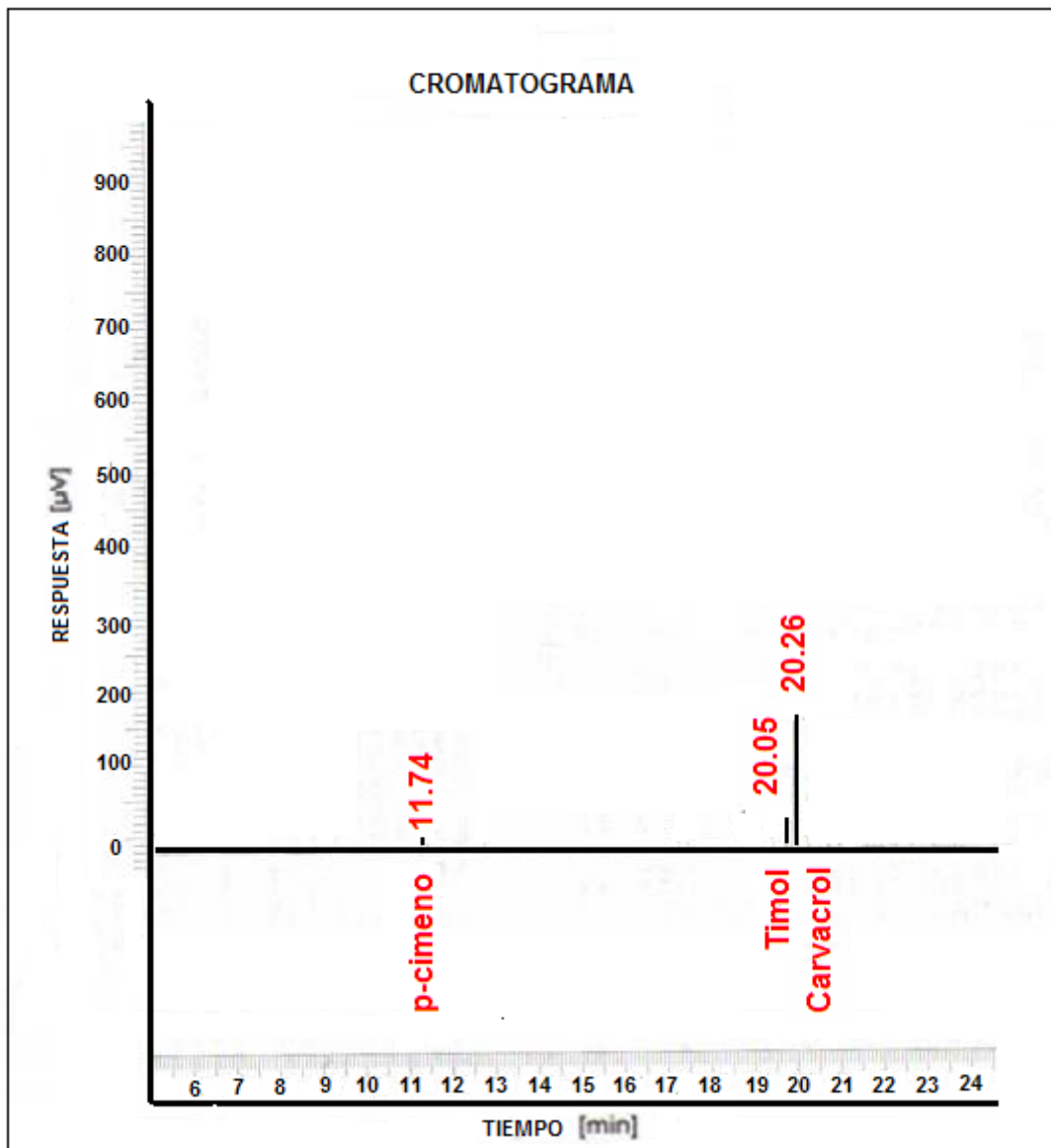


Fig. 11. Cromatograma obtenido a partir del análisis químico con Cromatografía de Gases (GS). Se observan los monoterpenos encontrados.

Tabla 3. Monoterpenos encontrados en el análisis de cromatografía de gases (CG), el pico que presentan en el cromatograma, el tiempo en el cual se encontraron, área y altura que ocupa del total del aceite.

Compuesto	Pico Número	Tiempo [min]	Área [μ V-s]	Altura [μ V]	Área [%]	Área/altura [s]
p-cimeno	2	11.747	0.85	1.44	0.00	0.5899
Timol	9	20.050	55359.69	29774.78	6.66	1.8593
Carvacrol	10	20.261	488742.14	179508.91	58.77	2.7227

9.3 Resultados de la toxicidad

En la tabla 4 se puede observar que las diferentes concentraciones de los extractos acuosos de *Monarda austromontana* Epling no producen un daño tóxico en las larvas tratadas. No fue posible determinar la dosis letal media (LD₅₀) debido a que los índices de supervivencia de las moscas en todas las concentraciones utilizadas fue mayor o igual al 85%, sin embargo, las concentraciones utilizadas se establecieron conociendo la cantidad de planta que contiene una bolsa de té comercial que puede ser la probable proporción del “agua de uso” que se prepara para el consumo humano de la planta.

Tabla 4. Muestra los resultados de la prueba de toxicidad realizados en moscas con fenotipo Silvestre y Serrate cuyo índice de supervivencia comparado con el control, es mayor del 85% en todas las concentraciones.

Muestra	Silvestre (transheterocigotos)			Serrate (cis heterocigotos)			Total	% de supervivencia
	Hembras	Machos	Subtotal	Hembras	Machos	Subtotal		
Control	14	13	27	10	10	20	47	
10% Infusión	12	14	26	9	6	15	41	87%
5% Infusión	11	7	18	12	12	24	42	89%
1% Infusión	8	11	19	9	13	22	41	87%
10% Decocción	9	13	22	7	11	18	40	85%

9.4 Resultados del Bioensayo SMART

El tipo de manchas encontradas con las diferentes concentraciones de los extractos acuosos de *Monarda austromontana* Epling se puede observar en la tabla 5, destacando así que el número total de manchas de cada concentración comparado con el control es similar.

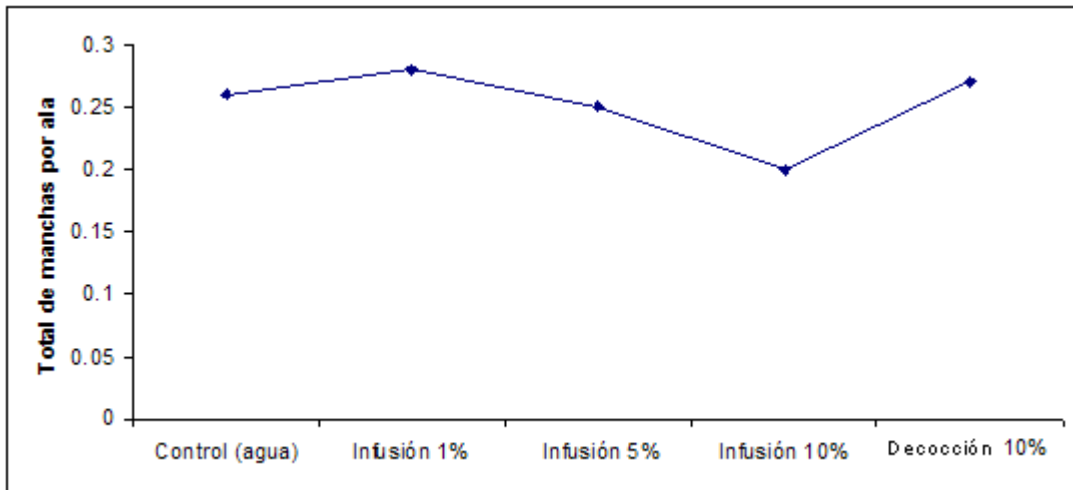
El comportamiento en la aparición de manchas/ala resulta asintótico (Gráfica 1). Mientras la frecuencia de manchas sencillas o chicas (de 1 a 2 células afectadas) es claramente mayor a la frecuencia de manchas grandes (>2 células afectadas), (Grafica 2). Las manchas gemelas sólo aparecen en el control y no se encontraron en ninguna concentración de los extractos acuosos.

La tabla 6 muestra la distribución de manchas de acuerdo con el tamaño, no se encontraron manchas con más de 64 células afectadas, la mayoría de las manchas fueron de una sola célula afectada.

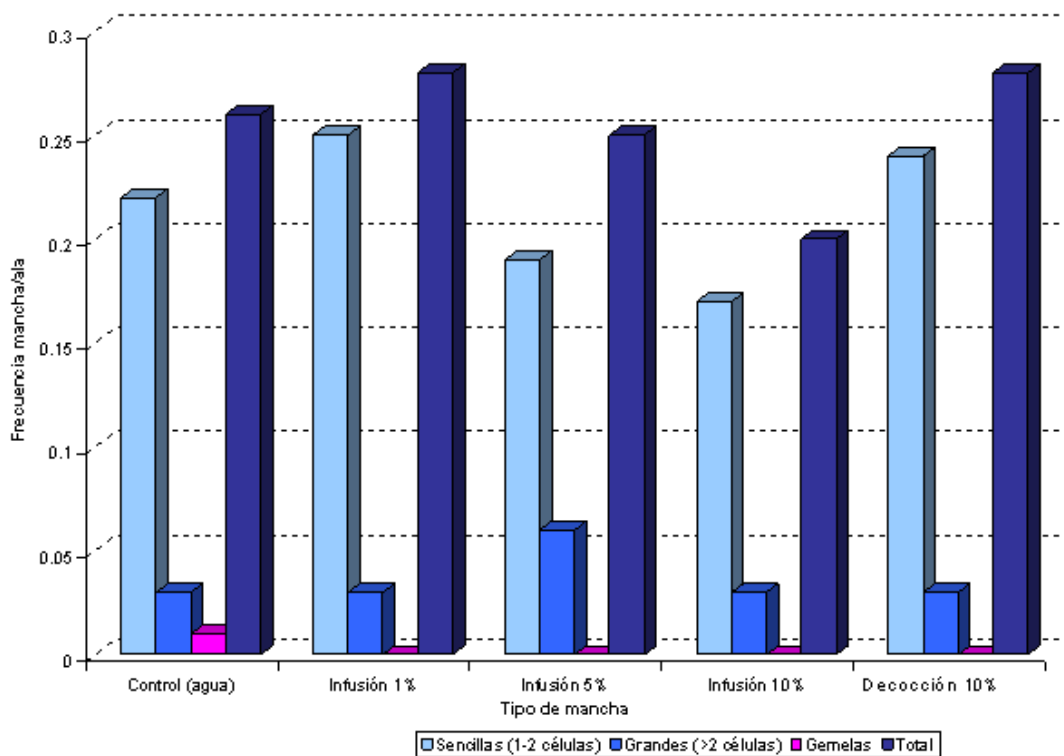
La tabla 7 muestra a manera de resumen la frecuencia y el tamaño promedio de las manchas, se indica con un signo negativo en las manchas sencillas que los extractos acuosos de *M. austromontana* Epling no produjeron diferencias estadísticamente significativas y por lo tanto no hubo un efecto genotóxico. En el caso de las manchas grandes y gemelas se obtuvo un resultado inconcluyente.

Tabla 5. Tipos de manchas obtenidas en células del ala de *D. melanogaster* mwh + / + flr³ expuestos 48 horas a diferentes concentraciones de extractos acuosos de *Monarda austromontana* Epling.

Muestra	Sexo	Tipos de manchas				
		# de alas	mwh	flr ³	gemelas	Total
Control (agua)	Hembras	60	18 (0.30)	0 (0.00)	0 (0.00)	18 (0.30)
	Machos	60	12 (0.20)	0 (0.00)	1 (0.02)	13 (0.22)
H + M		120	30 (0.25)	0 (0.00)	1 (0.01)	31 (0.26)
Infusión 1%	Hembras	60	21 (0.35)	0 (0.00)	0 (0.00)	21 (0.35)
	Machos	60	13 (0.22)	0 (0.00)	0 (0.00)	13 (0.22)
H + M		120	34 (0.28)	0 0.00	0 (0.00)	34 (0.28)
Infusión 5%	Hembras	60	20 (0.33)	0 (0.00)	0 (0.00)	20 (0.33)
	Machos	60	10 (0.17)	0 (0.00)	0 (0.00)	10 (0.17)
H + M		120	30 (0.25)	0 (0.00)	0 (0.00)	30 (0.25)
Infusión 10%	Hembras	60	11 (0.18)	0 (0.00)	0 (0.00)	11 (0.18)
	Machos	60	13 (0.22)	0 (0.00)	0 (0.00)	13 (0.22)
H + M		120	24 (0.20)	0 (0.00)	0 (0.00)	24 (0.20)
Decocción 10%	Hembras	60	18 (0.30)	0 (0.00)	0 (0.00)	18 (0.30)
	Machos	60	15 (0.25)	0 (0.00)	0 (0.00)	15 (0.25)
H + M		120	33 (0.28)	0 (0.00)	0 (0.00)	33 (0.28)



Gráfica 1. Frecuencia de mancha/ala obtenida con extractos acuosos de *Monarda austromontana* Epling en tratamiento crónico, puede observarse un comportamiento similar entre las diferentes concentraciones y el control.



Gráfica 2. Frecuencia de los tipos de manchas inducidas por extractos acuosos de *Monarda austromontana* Epling en organismos *mwh + / + flr³* durante el tratamiento crónico.

Tabla 7. Resumen de los resultados obtenidos después de la exposición de larvas de *D. melanogaster mwh + / + flr³* expuestos a diferentes extractos acuosos de *Monarda austromontana* Epling

Muestra	Número moscas	Manchas por ala (Número de manchas)								Manchas con clon <i>mwh</i>	Tamaño promedio del clon	Frecuencia de formación de clones X 10 ⁻⁵	
		Sencillas (1-2 células) m=2		Grandes (>2 células) m=5		Gemelas m=5		Total m=2				Sin corrección de tamaño	Con corrección de tamaño
		Núm.	Frec.	Núm.	Frec.	Núm.	Frec.	Núm.	Frec.				
Control (agua)	60	27	0.44	3	0.06	1	0.02	31	0.52	31	1.48	1.1	
Infusión 1%	60	30-	0.50	4i	0.06	0i	0.00	34-	0.60	34	1.71	1.2	0.1
Infusión 5%	60	23-	0.40	7i	0.12	0i	0.00	30-	0.50	30	2.00	1.0	0.0
Infusión 10%	60	21-	0.34	3i	0.06	0i	0.00	24-	0.40	24	1.54	0.8	-0.2
Decocción 10%	60	29-	0.5	4i	0.06	0i	0.00	33-	0.60	33	1.42	1.1	0.1

Estadística de acuerdo con Frei y Würigler (1988): + (positivo); - (negativo); w⁺ (débil positivo); i (inconcluso); m= factor de multiplicación.

10. Discusión

En países en desarrollo el 80% de la población depende de la medicina tradicional para cuidados primarios de salud y en muchos países desarrollados del 70 al 80% de la población usa medicina tradicional de manera alterna o complementaria (OMS, 2009)¹, aún con la importancia que tienen las plantas medicinales en el mundo, muy pocas han sido estudiadas química y farmacológicamente, a pesar de saberse que las plantas pueden producir sustancias capaces de dañar el acervo genético (Ebadi, 2000).

Desde el inicio de la toxicología genética se han diseñado y puesto a prueba muchos ensayos para detectar agentes que puedan dañar el DNA, estos estudios han demostrado que un solo ensayo no es capaz de detectar todos los efectos genotóxicos ocasionados por un compuesto químico, por tanto, la capacidad de un agente químico de causar genotoxicidad se determina con un conjunto de ensayos. Hay ensayos *in vitro* e *in vivo* ambos con ventajas y desventajas, los ensayos *in vitro* tienen como ventajas ser de bajo costo, son fáciles de conducir y no requieren del uso de animales directamente, pero requieren de suplementos que activen enzimas para simular el metabolismo de los mamíferos y no toman en consideración otros factores relacionados como la farmacocinética y los mecanismos de reparación del DNA, variables que sí están incluidas en los ensayos *in vivo*, procesos que pueden, en algunos casos, modular la genotoxicidad dentro del animal utilizado como prueba (Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico)².

Uno de estos ensayos *in vivo* para evaluar el daño provocado a nivel del DNA ocasionado por diversos agentes químicos o físicos con los cuales el ser humano tiene contacto es el ensayo SMART que utiliza como sistema de prueba a *Drosophila melanogaster*, organismo cuyo metabolismo para la transformación de xenobióticos es comparable al de mamíferos. Esta prueba presenta varias ventajas entre las que destacan: permite la detección de mutaciones puntuales y la recombinación mitótica como efecto de la exposición a genotóxicos. Asimismo la cantidad de células somáticas de las larvas expuestas al tratamiento son cerca de 26,000 y con esta prueba es posible

¹ Organización Mundial de la Salud disponible en: www.who.int/es/

² OCDE disponible en: <http://www.oecd.org>

obtener resultados en una sola generación de moscas (Graf, 1984). Estos resultados se pueden verificar y reconsiderar varias veces gracias a que el material de estudio (alas de moscas adultas) se encuentra contenido en preparaciones con Fauré permitiendo su conservación de manera permanente (Graf, 1984).

La prueba SMART se ha empleado para valorar tanto agentes individuales como mezclas complejas en diferentes investigaciones alrededor del mundo. Algunos estudios refieren su utilización en la identificación de daños provocados por metales pesados (Yesilada, 2001), partículas ambientales (Delgado-Rodriguez *et al.*, 1999), herbicidas (Heres *et al.*, 2008), fármacos (Silva *et al.*, 2002) y recientemente se han hecho evaluaciones del potencial genotóxico de plantas utilizadas en la medicina tradicional (Esparza-Garrido, 2006; Ordáz-Tellez *et al.*, 2007; Martínez-Toledo *et al.*, 2008). De tal suerte podemos decir que nos encontramos ante una prueba versátil en sus aplicaciones y validada por la comunidad científica.

Los resultados obtenidos en esta investigación muestran que los extractos acuosos de *Monarda austromontana* Epling no presentan un efecto genotóxico bajo las condiciones de este análisis, ya que no hay un aumento estadísticamente significativo de las manchas con respecto al testigo concurrente. Los resultados inconclusos para las manchas gemelas se deben a que no hay un parámetro de comparación, ya que en el control aparecen este tipo de manchas y no aparecen en las series tratadas, estas manchas en el testigo concurrente pueden indicar que los marcadores *flr*³ y *mwh* siguen conservándose en la cepa de moscas utilizadas.

Este trabajo se suma a otras investigaciones que evalúan el efecto genotóxico de plantas utilizadas en la medicina tradicional bajo el mismo ensayo. Ejemplo de ello son *Malmea depresa*, *Equisetum myriochaetum* y *Cecropia obtusifolia* plantas utilizadas en la medicina tradicional para el tratamiento de la diabetes mellitus tipo 2, las tres plantas presentaron resultados similares a los obtenidos en este trabajo, ninguna mostró tener un efecto genotóxico (Esparza-Garrido, 2006; Ordáz-Tellez *et al.*, 2007; Martínez-Toledo *et al.*, 2008). En otro estudio realizado con plantas utilizadas en la medicina tradicional para problemas de inflamación (*Matricaria chamomilla*, *Tilia cordata*, *Mentha piperita*, *Mentha pulegium*, *Uncaria tomentosa* y *Valeriana*

officinalis) también se utilizó el ensayo SMART para determinar su probable actividad genotóxica y antigenotóxica, ninguna de las plantas mostró un incremento significativo en las series tratadas con infusiones de cada una de ellas con respecto al control (Romero-Jiménez, 2005).

A su vez el ensayo SMART se utilizó para la valoración de la genotoxicidad de aceites esenciales presentes en *Origanum compactum*, este orégano es perteneciente a la misma familia a la cual pertenece *M. austromontana* Epling y sus aceites esenciales tampoco mostraron un efecto genotóxico (Mezzoug, 2007).

Debido a la falta de antecedentes fitoquímicos de *M. austromontana* Epling se realizaron análisis químicos de la planta para tener información acerca de la presencia de algunos grupos de metabolitos secundarios en este orégano. La diferencia de polaridad de los disolventes utilizados en la extracción es una propiedad que permite que cada disolvente extraiga diferentes compuestos de la planta para después ser analizados en la cromatografía en capa fina. Mediante esta técnica se mostró que *M. austromontana* Epling tiene una gran cantidad de triterpenos, estos metabolitos secundarios forman parte de un grupo diverso de productos naturales derivados del escualeno. Dentro de los triterpenos se encuentran los fitoesteroles, que son componentes estructurales importantes de las membranas de las células de las plantas, de manera libre sirven para estabilizar la capa fosfolipídica en la membrana celular de los vegetales, justo lo que hace el colesterol en las células animales. El interés de los triterpenos a aumentado a partir de que se encontró que tienen propiedades en la disminución del colesterol (Liby *et al.*, 2007). Están distribuidos ampliamente en las plantas, los oleananos y los ursanos se encuentran juntos frecuentemente y se han reportado para un amplio número de familias, incluyendo la Lamiaceae, algunos estudios han probado que los ácidos ursólico y oleanoico presentan un efecto protector contra el daño al DNA por peroxidación en células leucémicas L1210, K562 y HL-60 (Ovesná *et al.*, 2006).

Otros metabolitos secundarios encontrados en *M. austromonatan*a Epling son los fenoles y los flavonoides. A los fenoles se les atribuye divergentes actividades fisiológicas y bioquímicas dentro de la planta, algunos funcionan como deterrentes (isoflavonoides), como sustancias de defensa

(tanino) o aleloquímicos. Además se sabe que estos compuestos tienen la propiedad de ser antioxidantes ya que ayudan a prevenir o remover las moléculas de oxígeno antes de que provoquen algún daño (Yuting *et al.*, 1990). Las bandas encontradas en la cromatografía en capa fina con extracto de acetato de etilo y metanol reveladas para detectar fenoles coinciden con las bandas encontradas por el revelador de permanganato de potasio, este compuesto es un potente oxidante que detecta carbonos insaturados (compuestos con dobles o triples ligaduras) que son capaces de oxidarse y proteger a las moléculas celulares susceptibles a los radicales libres (Shriner, 2005), esta coincidencia en bandas significa que estos compuestos protectores son los fenoles. En el extracto con hexano no se encontró esta coincidencia entre bandas, debido a que el disolvente extrae otro tipo de compuestos por ser menos polar, sin embargo hubo bandas que reaccionaron al permanganato de potasio, esto se puede deber a la presencia de cadenas lineales o ramificadas que dan positiva la respuesta, dichas cadenas pueden pertenecer a otro grupo químico como los poliacetilenos que tienen triples ligaduras (Yurkanis, 2008).

Por su parte los flavonoides en las plantas tienen como una de sus funciones protegerlas contra infecciones causadas por microorganismos. Parte de la pigmentación de las plantas es debida a los flavonoides, lo que permite la interacción planta-animal, ayudando a atraer a los animales a las flores y frutos, estos animales servirán como agentes transportadores de polen y semillas, las antocianinas son el grupo más extendido de los flavonoides pigmentados y son las responsables de la mayoría de los colores rojo, rosado, morado y azul, debido a que colorean flores y frutos. Las flavonas y los flavonoles son otros dos grupos de flavonoides que también se encuentran en las flores, estos compuestos absorben luz generalmente a longitudes de onda más cortas que las antocianinas y funcionan como señales de atracción de insectos. Estos compuestos también están presentes en las hojas de las plantas verdes, protegiendo a las células del exceso de radiación UV-B (280-320nm), se acumulan en las capas epidérmicas de hojas y tallos, y absorben luz intensamente en la región del UV-B permitiendo a la luz visible (fotosintéticamente activa) penetrar de forma ininterrumpida (Grayer, 1989).

Los alcaloides son un grupo de metabolitos secundarios que no fueron detectados en los extractos de *M. austromontana* Epling, su ausencia es de suma importancia, ya que son especialmente tóxicos para los mamíferos. Para las plantas representan una fuente de protección a predadores (Hartmann, 1992). Casi todos los alcaloides son tóxicos para los humanos cuando son ingeridos en cantidades suficientes, sin embargo, a pequeñas dosis pueden ser útiles desde un punto de vista farmacológico. A nivel celular, el mecanismo de acción de los alcaloides en animales es bastante variable. Muchos alcaloides interfieren con componentes del sistema nervioso, especialmente los transmisores químicos; otros afectan al transporte a través de la membrana, a la síntesis de proteínas o a actividades enzimáticas diversas (Taiz y Zeiger, 2006).

La muestra analizada de *M. austromontana* Epling en cromatografía de gases presenta carvacrol al 58.77%, timol al 6.66% y el p-cimeno es apenas detectable, estos compuestos son monoterpenos que presentan numerosas plantas aromáticas (De Vincenzi *et al.* 2004). Los monoterpenos son la clase más simple de isoprenoides con una estructura característica de 10 carbonos, a partir de la unión de dos unidades de isopreno. Se conocen más de 1000 que se encuentran de manera natural principalmente en plantas vasculares. El interés del conocimiento de estos productos se origina en su utilidad comercial: en la fabricación de perfumes ya que los monoterpenos constituyen el 90% de los aceites esenciales y para la elaboración de condimentos de comida (Bakkali *et al.* 2008). Los monoterpenos tienen actividad antibacterial, antimicótica y anticancerígena, estas propiedades han hecho a las industrias farmacéutica y agrícola interesarse en la extracción de estos productos (Bramley, 1997). En particular se ha evaluado la actividad antimicrobiana de monoterpenos como el carvacrol y el timol, metabolitos secundarios encontrados en cantidades considerables mediante el análisis químico de *Monarda austromontana* Epling por cromatografía de gases (CG), estas pruebas de su potencial bactericida se han hecho con oréganos de importancia económica para el estado de Chihuahua, han mostrando que las diferentes concentraciones de estos monoterpenos muestran efectos bactericidas de cepas del género *Vibrio* (Paredes-Aguilar *et al.*, 2007) y en otras bacterias relacionadas como *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Salmonella typhimurium* (Álvarez,

1999). Esto tiene gran relevancia, debido a que estas bacterias representan un problema de salud en varios países principalmente en aquellos en desarrollo, como es el caso de México, la bacteria *Vibrio cholerae* es un agente causal de epidemias en países en esta situación económica, se presenta endémicamente en Asia, África, el Mediterráneo y América central y del sur. Por su parte la *Salmonella typhimurium* causa dolores abdominales, diarrea y vómitos, no es tan severa como la *S. typhi* causante de salmonelosis, pero se ha observado que algunas cepas de esta bacteria han desarrollado resistencia a fármacos como la ampicilina al igual que la bacteria *Staphylococcus aureus* que se presenta principalmente en pacientes hospitalizados (OMS 2009).

En países en desarrollo los registros de enfermedades causadas por *Escherichia coli* son limitados, aunque esta bacteria es un problema de salud mundial ya que se transmite por ingesta de alimentos contaminados o mal cocidos. El carvacrol y el p-cimeno son antimicrobianos efectivos contra *E. coli* en jugos de manzana sin pausterizar (Kisko y Roller, 2005), por lo que es importante resaltar que el carvacrol, el timol y el p-cimeno se encontraron como parte de los fitoquímicos en *M. austromontana* Epling. Este tipo de antimicrobianos son investigados en la actualidad para reemplazar a los conservadores sintéticos por compuestos naturales que no se relacionen con alergias ni enfermedades (Paredes-Aguilar *et al.*, 2007)

Los estudios que avalan las propiedades como antioxidante del timol y el carvacrol, son los realizados con el orégano mexicano *Lippia berlandieri* Schauer, estos experimentos fueron realizados con aceite de oliva y aceite de soya a altas temperaturas y se mostró que el orégano reduce la cantidad de peróxidos en los mismos, atributo otorgado por su composición de timol, carvacrol y ácidos fenólicos (Chaquilla *et al.* 2007). En torno a la evaluación del carvacrol y el timol como agentes antioxidantes, se concluyó que el timol es un antioxidante más potente que el carvacrol, ya que el timol tiene un mayor impedimento estérico en su grupo fenólico (Yanishlieva *et al.*, 1999).

Es difícil otorgar a un compuesto una actividad específica dentro de la planta ya que la interacción del gran número de fitoquímicos que la constituyen dificulta entender los mecanismos mediante los cuales producen una respuesta en el organismo. Teóricamente pueden generarse tanto reacciones sinérgicas como antagónicas entre los compuestos químicos de una mezcla compleja, y

en particular de fitoquímicos presentes en los extractos vegetales. Aunada a esta complejidad, los compuestos químicos varían dependiendo de la época y la hora del día en la cual se colectó la planta e incluso la forma de extraerla de su sustrato. Esto se puede observar en los rendimientos de extracción, donde el ejemplar colectado para la realización de esta investigación muestra que la mayoría de los grupos de metabolitos químicos encontrados son de polaridad similar a la del hexano que corresponden a triterpenos. Los fenoles y flavonoides aparecieron con menos frecuencia que los terpenos y concuerdan en su polaridad con el metanol.

Este trabajo representa un primer paso hacia la aprobación, por las instancias gubernamentales pertinentes, sobre el uso de *M. austromontana* Epling ya sea como condimento, o como medicina alterna para tratar diversos problemas primarios de salud; inclusive por el tipo de monoterpenos encontrados abre la posibilidad de emplear a la planta en la industria de alimentos como conservador.

11. Conclusiones

- Los extractos acuosos de *Monarda austromontana* Epling no mostraron ser tóxicos.
- Las concentraciones utilizadas no resultaron ser genotóxicas bajo las condiciones experimentales del ensayo *in vivo* SMART.
- El ejemplar de *Monarda austromontana* Epling empleado para esta investigación está compuesto principalmente por terpenos: triterpenos y monoterpenos en cantidades considerables de carvacrol 58.7% y timol 6.66%.
- Debido a las concentraciones presentes en la planta de carvacrol y timol se recomienda hacer pruebas que evalúen la actividad antimicrobiana de *Monarda austromontana* Epling en las bacterias *Vibrio cholerae*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Salmonella typhimurium*.

12. Bibliografía

- Álvarez, C A. (1999). Determinación y cuantificación de la capacidad antimicrobiana y antioxidante de las fracciones polares del orégano (*Origanum vulgare* L.). Tesis de Maestría. Facultad de Ciencias Químicas. Universidad Autónoma de Chihuahua.
- Alves de Rezende, A., Graf, U., da Rosa-Guterres, Z., Estevam-Kerr, W. y Spanó, M. (2009). Protective effects of proanthocyanidins of grape (*Vitis vinifera* L.) seed of DNA damage induced by doxorubicin in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. Food Chem. Toxicol. Online.
- Ames, B. N. (1979). Identifying environmental chemicals causing mutations and cancer. Science, 204:587-593
- Ashburner, M. (1989). *Drosophila* a laboratory handbook, First Edition, Cold Spring harbour laboratory press, Nueva York. pp 139-271.
- Auerbach, C., Robson, J.M. y Carr. J.G. (1947). The chemical production of mutations. Science 105:243
- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D. e Idaomar, M. (2008). Biological effects of essential oils- A review. Food Chem.Toxicol. 46: 446-475.
- Barquín, M. (1984). Historia de la Medicina. Su problemática actual, Francisco Méndez Oteo (Ed). 400 p.
- Boulétrèau-Merle, J. (1971). Influences génétiques sur la rétention des œufs chez les femelles vierges de *Drosophila melanogaster* et le nombre d'œufs formés a partir des réserves larvaires. Ann. Zool. Ecol. Anim. 3: 481-492.
- Bramley (1997). Isoprenoid Metabolism. En: Plant biochemistry. Dey, P.M. y Harborne J. B. (Eds). Academic Press. San Diego, E.U.A. pp 417-434.
- Brusick, D. (1987). Principles of Genetic Toxicology, 2da. Edición, Plenum, Nueva York. pp 1-9.
- Bye. R. (1986). Medicinal Plants of the Sierra Madre: Comparative study of Tarahumara and Mexican Market Plants. Economy Botany. 40: 103-124.
- Bye. R., Linares, E., y Estrada, E. (1995). Biological diversity of medicinal plants in Mexico, Phytochemistry of Medicine Plants, Edited by John T. Arnason et al. Plenum Press, Nueva York. pp 65-82.

- Castillo-Juárez, I., Gonzales, V., Jaime-Aguilar, H., Martínez, G., Linares, E., Bye, R. y Romero, I. (2009). Anti-*Helicobacter pylori* activity of plants used in Mexican traditional medicine for gastrointestinal disorders. *J. Ethnopharmacol.* 122: 402-405.
- Cattanach, B.M. (1966). Chemically induced mutations in mice. *Mutat. Res.* 3:346-353
- Chaquilla, G., Torres, V., Ballinas, M. L., Gastélum, M. G., Silva, R. y Névarez-Moorilloón, G. (2008). Actividad antioxidante del aceite esencial del orégano mexicano (*Lippia berlandieri* Schauer) en sistemas alimenticios. *3era reunión nacional sobre orégano*. Del 22 al 24 de Agosto del 2007. Saltillo, Coah., México.
- De Vicenzi, M., Stamatii, A., De Vicenzi, A. y Silano M. (2004). Constituents of aromatic plants : Carvacrol. *Fitoterapia* 75 : 801-804.
- Delgado-Rodríguez, A., Ortiz-Marttelo, R., Villalobos-Pietrini, R., Gómez-Arroyo, S. y Graf, U. (1999). Genotoxicity of organic extracts of airborne particles in somatics cells of *Drosophila melanogaster*. *Chemosphere* 39: 33-43.
- Ebadi, M. (2000). *Pharmacodynamic Basis of Herbal Medicine*. CRC PRESS. New York. pp 726.
- Esparza-Garrido, R. (2006). Determinación del efecto genotóxico de *Malmea depressa* en células somáticas de *Drosophila melanogaster*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias, UNAM.
- Fragiorge, E. J., Alves de Rezende, A. A., Graf, U. y Spanó, M. A. (2008). Comparative genotoxicity evaluation of imidazolinone herbicides in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. *Food Chem. Toxicol.* 46: 393-401.
- Frei, H. y Würzler, F. E. (1988). Statistical methods to decide whether mutagenicity test data from *Drosophila* assays indicate a positive, negative or inconclusive result. *Mutant. Res.* 203: 297-308.
- García-Bellido A. y Merriam J. (1971) Parameters of the wing imaginal disc development of *Drosophila melanogaster*. *Develop. Biol.* 24: 61-87.
- Gilbert S. F. (2003). Metamorphosis, regeneration, and aging. En: *Developmental Biology*. Sinauer Associates, Inc. Publishers. Sunderland, Massachusetts. 7ma. edición. pp 575-612.
- Gordon, C. y Sang, J. (1941). The relation between nutrition and exhibition of the gene antennaless (*Drosophila melanogaster*). *Proc. R. Soc. Lond.* 130B: 151-184.

- Graf, U., Würigler, F.E., Katz, A.J., Frei, H., Juon, H., Hall, C.B. y Kale P.G. (1984) Somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. Environ. Mutagen. 6: 153-188.
- Graf, U., Würigler, F.E., Frei, H y K-igi, A. (1986) Somatic cells of *Drosophila*: Fast in vivo detection of genotoxic activity, Mutat. Res. Environmental Mutagenesis and Related Subjects. 164: 291-292.
- Grayer, R. (1989). Flavonoids. En: Methods in plants biochemistry. Plant Phenolics. Dey P. M. y Harborne, J. B. (Eds.). Academic Press. San Diego, E.U.A. Vol. 1: pp 283-324.
- Hartmann T. (1992) Alkaloids. En: Hervíbores: Their Interactions with Secondary Plant Metabolites. Vol. 1: The Chemical Participants, 2da. Edición, G.A. Rosenthal y M. R. Berenbaum, (eds.), Academic Press, San Diego, CA. pp 79-121.
- Heres-Pulido, M.E., Lomberra-Hernández, S., Dueñas-García, I., Perales-Canales, I., Castañeda-Partida, L., Rocha-Ortiz, C., Flores-Maya, S., Durán-Díaz, A. y Graf, U. (2008). Genotoxicity of triasufuron in the wing spot test of *Drosophila melanogaster* is modulated by winter wheat seedlings. Mutat. Res. 653: 70-75.
- Hertzog, J., Graf, U., Reguly M. L. y Rodrigues H. H. (1999). The synergistic effects of vanillin on recombination predominate over its antimutagenic action in relation to MMC-induced lesions in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. Mutat. Res. 444: 355-365.
- Jenkin, P. M. y Hinton, H. E. (1966) Apolysis in arthropod moulting cycles. Nature 211:871.
- Kisko, G. y Roller, S. (2005). Carvacrol and p-cymene inactivate *Escherichia coli* O157:H7 in apple juice, BMC Microbiology 5: 36–44.
- Li, A. P. y Heflich, R. H. (1991). Genetic Toxicology, CRC Press, Florida. pp 1-12.
- Liby, K. T., Yore, M. M., Sporn, M. B. (2007). Triterpenoids and rexinoids as multifunctional agents for the prevention and treatment of cancer. Nat. Rev. Cancer 7: 357-369.
- Lindsley, D. L. y Zimm, G. G. (1992). The genome of *Drosophila melanogaster*. Vol.2, Academic press. San Diego, California
- Manahan, S. (2003). Toxicological Chemistry and Biochemistry, 3era. Edición. Lewis Publishers, Florida. pp 115-116.
- Martínez-Toledo, V., Ordáz-Tellez, M. G., Castañeda-Sortibrán, A. N., Andrade-Cetto, A. y Rodríguez-Arnaíz, R. (2008) Genotoxicity testing of *Cecropia obtusifolia* extracts in two in vivo assays: The wing somatic

mutation and recombination test of *Drosophila* and the human cytokinesis-block micronucleus test. J. Ethnopharmacol. 116: 58-63.

- Mezzoug, N., Elhadri, A., Dallouh, A., Amkiss, S., Skali, N. S., Abrini, J., Zhiri, A., Baudoux, D., Diallo, B., El Jaziri, M. e Idaomar, M. (2007). Investigation of the mutagenic and antimutagenic effects of *Origanum compactum* essential oil and some of its constituents. Mutat. Res. 629: 100-110.
- Moreno-Salazar, S.F., Robles-Zepeda, R. E., y Johnson, D. E. (2008) Plant folk medicines for gastrointestinal disorders among the main tribes of Sonora, Mexico, Fitoterapia 79 132-141.
- Ordaz-Télez, M.G., Bárcenas-Rodríguez, H., Quevedo-Olivares, G., Castañeda-Sortibrán, A. N., Andrade-Cetto, A. y Rodríguez-Arnaiz, R. (2007). A phytotherapeutic extract of *Equisetum myrichaetum* is no genotoxic either in the *in vivo* wing somatic test of *Drosophila* or in the *in vitro* human micronucleus test. J. Ethnopharmacol. 111: 182-189.
- Osaba, L., Rey, M. J., Aguirre, A., Alonso, A. y Graf, U. (2002). Evaluation of genotoxicity of captan, maneb and zineb in the wing spot test of *Drosophila melanogaster*. role of nitrosation. Mutat. Res. 518: 95-106.
- Ovesná, Z., Kozics, K. y Slamenová, D. (2006). Protective effects of ursolic acid and oleanolic acid in leukemia cells. Mutat. Res. 600: 131-137.
- Paredes-Aguilar, M.C., Gastélum, M. G. y Silva, R. (2007). Efecto antimicrobiano del orégano mexicano (*Lippia berlandieri* Schauer) y de su aceite esencial sobre cinco especies del género *Vibrio*. Rev. Fitotec. Mex. 30: 261-267.
- Poodry, C.A. y Schneiderman, H. A. (1970). The ultraestructure of the developing leg of *Drosophila melanogaster* Wilhelm Roux´ Arch. Emtwicklungsmech Org. 166: 1-44.
- Rodríguez-Arnaiz, R. (2003). *Drosophila* como organismo en la biología experimental. En: Biología celular y molecular. L. F. Jiménez y H. Merchant (Eds) Editorial Pearson Education (Addison-Wesley-Prentice Hall) 761-791.
- Romero-Jiménez, M., Campos-Sánchez, J., Analla, M., Muñoz-Serrano, Andres. y Alonso-Moraga, A. (2005). Genotoxicity and anti-genotoxicity of some tradicional medicinal herbs. Mutat. Res. 585: 147-155.
- Rusell, W. I. (1951) X-ray induced mutations in mice. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 16:327-330.

- Rzedowsky, J. (1994). Vegetación en México. 6ta. Edición. Editorial Limusa. México D.F. pp 237-261.
- Shriner, R., Fuson, R. y Curtin, D. (2005). Identificación sistemática de compuestos orgánicos. 1era. Edición. Editorial Limusa. pp 166-168.
- Silva, C.K., Reguly, M. L., Graf, U. y Rodrigues H.H. (2002). Somatic recombination: a major genotoxic effect of two pyrimidine antimetabolitic chemotherapeutic drugs in *Drosophila melanogaster*. *Mutat. Res.* 514: 95-103.
- Silva, R. V. (2005). El orégano (*Lippia berlandieri* Schauer) una alternativa agroindustrial para las zonas áridas y semiáridas de México. En: Orégano aprovechamiento, cultivo e industrialización en México. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo estado de México.
- Sokal, R.R., Ehrlich, P. R., Hunter, P. E. y Schlager G. (1960). Some factors affecting pupation site of *Drosophila*. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 53: 174-182.
- Sugimura, T., Sato, S., Nagao, M., Yahagi, T., Matsushima, T., Seino, Y., Takeuchi, M., y Kawachi, T (1976) Overlapping of carcinogens and mutagens: En: Fundamentals in cancer Prevention (P.N. Magee, T. Matsushima, T. Sugimura, and S. Takayama, eds.), University of Tokyo Press, Tokyo, and University Park Press, Baltimore, Maryland. pp 191-215.
- Taiz, L. y Zeiger, E. (2006). Fisiología vegetal. Publicaciones de la Universidad de Jaume I. 3era. Edición. E.U.A. (D.L) pp 529-580.
- van Schaik, N. y Graf, U. (1991). Genotoxicity evaluation of five tricyclic antidepressants in the wing somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Mutat. Res.* 260: 99-104.
- Waizel, J. (2006). Las plantas en la historia de la medicina. En: Las plantas medicinales y las ciencias, una visión multidisciplinaria. Waizel J. (Coord) Instituto Politécnico Nacional. pp 181-225.
- Wen, W. (1979) "China: un herbolario de más de 5000 especies", en Las plantas medicinales florecen de nuevo. El correo de la UNESCO; XXXII: 25-27.
- WHO Information (1996). "Traditional Medicine". Fact sheet, número 134, septiembre, World Health Organization.
- Yanishlieva, N. V., Marinova, E. M., Gordon, M. H., y Reneva, V. G. (1999). Antioxidant activity and mechanism of action of thymol and carvacrol in two lipid systems. *Food Chem.* 64: 59-66.

- Yesilada, E. (2001). Genotoxicity testing of some metals in the *Drosophila* wing somatic and recombination test. *Environ. Contam, Toxicol.* 66: 464-469.
- Yurkanis-Bruice, P. (2008). *Química orgánica*. 5ta. Edición. Pearson Education, México. pp 259-260.
- Yuting, C., Rongliang, Z., Zhongjian, J., Young, J. (1990). Flavonoids as superoxide scavengers and antioxidants. *Free Radic. Biol. Med.* 9: 19-21.

Páginas electrónicas consultadas:

- Phytochemical and ethonobotanical Databases: <http://www.ars-grin.gov/duke>
- Plants DataBase: <http://plants.usda.gov/java/profile?symbol=MOCIA>
- Aguilar et al 1994: <http://www.publicaciones.ipn.mx/PDF/1490.pdf>
- GRIN Taxonomy for plants: <http://www.ars-grin.gov/cgi-bin/npgs/html/taxon>
- Gardening.eu: <http://es.gardening.eu/arc/plantas/Arbustos/Monarda-austromontana-Epling>
- Henriette Kress: <http://www.henriettesherbal.com>
- FlyMove: http://www.anatomy.unimelb.edu.au/researchlabs/whittington/img/life_cycle.jpg
- Organización Mundial de la Salud: <http://www.who.int/es/>
- Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico: <http://www.oecd.org>