



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

Evaluación del potencial genotóxico de diversos
extractos de *Tecoma stans* en las células somáticas de
Drosophila melanogaster.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

P R E S E N T A :

MARCO ANTONIO CARBALLO ONTIVEROS

DIRECTORA DE TESIS :

DRA. ROSARIO RODRÍGUEZ ARNAIZ

2010





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

AGRADECIMIENTOS

Dra. Rosario Rodríguez Arnaiz, quiero agradecerle por haberme otorgado la oportunidad de ser parte de su equipo de trabajo en el Laboratorio de Genética, así como por su gran disposición en asesorarme en este proyecto de tesis y en atenderme en mis momentos de duda.

Dra. América Nitxin Castañeda Sortibrán, por a ver visto en mí en quién confiar y por haberme otorgado el privilegio de ser su servicio social. Asimismo quiero agradecerle su enorme apoyo en la realización de este proyecto [con tal de verme titulado].

M. en C. María Guadalupe Ordaz Téllez, le agradezco todos sus comentarios y observaciones al momento de realizar este proyecto. De igual manera por su amistad y su amabilidad.

A todos mis compañeros del Laboratorio de Genética: Alejandra, Lucero, Marco Mejía, Elizabeth, y Luis, por haber compartido varios momentos conmigo, y en especial a Angélica y Jimena por brindarme su apoyo en la realización de las preparaciones de mi tesis.

Al Grupo de Fitoquímica, dirigido por la Dra. María Cristina Pérez Amador Y Barón; por haberme dado la oportunidad de trabajar la parte de extracción de mi tesis en su laboratorio, y en particular a la Q. A. Verónica Muñoz Ocotero por haberme asesorado en ese momento, así como por su enorme amabilidad y paciencia.

Finalmente, al Dr. Adolfo Romo de Vivar, del Departamento de Productos Naturales del Instituto de Química (UNAM), por permitirme el uso del equipo de su laboratorio para obtener uno de los extractos de mi tesis.

DEDICATORIAS

A Francisco Javier Carballo Cruz (mi sabiduría),
María de Lourdes Irma Ontiveros Zárate (mi fortaleza), y
Luis Javier Carballo Ontiveros (mi valor).

Este proyecto va dedica a los tres puesto que son y serán siempre los pilares de mi vida. No encuentro las palabras para agradecerles su infinito amor y paciencia, pero sí puedo decirles lo orgulloso y afortunado que soy de tenerlos a mi lado todos los días.

A mis tíos, tías,
primos, primas,
sobrinos y sobrinas (Carballo y Ontiveros)

Por darme el privilegio de contar siempre con su afecto y por su constante atención y preocupación en saber de mis progresos. Es una gran responsabilidad y un gran gusto para mí el portar estos dos grandes apellidos.

A mis grandes amigos:

Raúl Armida, Marco Padilla, Sergio C. Lemus, y Sandra Toscano

El continuar fomentando nuestra amistad en tiempos después de la EMA ha sido la gran diferencia para mí y por ello quiero agradecerles el que todavía sigan buscándome como su amigo. Espero seguir contado con muchos gratos momentos al lado de ustedes.

A mis nuevos amigos y colegas:

Juan Manuel Bautista, Arturo Mendoza, Horacio Gómez, Anet Rivera, Ricardo Perez y
Alejandro García

Por la gran satisfacción de haberlos encontrado durante mi formación de biólogo y por los momentos que disfrutamos afuera y dentro de las clases. Hay muchas cosas por descubrir y ahora es nuestro turno de contribuir en la investigación.

Por último a:

Francisco Javier Carballo Ontiveros (mi hermano),
Guadalupe Zárate Rodríguez (Mamá Lupita),
Clemencia Cruz Luna (Abuelita Mencha), y
Manuel Carballo Hernández (Abuelicious).

Mis cuatro *einherjars*. Les agradezco el amor y la confianza que siempre depositaron en mí. Confío en que algún día nos volveremos a ver.

“Antes pensábamos que nuestro futuro estaba en las estrellas. Ahora sabemos que está en nuestros genes.”

James D. Watson

ÍNDICE

RESUMEN	1
I. ANTECEDENTES	2
1.1 Diabetes mellitus	2
1.1.1 Causas	2
1.1.2 Clasificación	3
1.1.3 Síntomas	4
1.1.4 Mortalidad	4
1.2 Tratamientos tradicionales	4
1.3 <i>Tecoma stans</i>	5
1.3.1 Taxonomía	6
1.3.2 Distribución	7
1.3.3 Compuestos activos	9
1.3.4 Toxicidad	10
II. INTRODUCCIÓN	11
2.1 Toxicología	11
2.1.1 Etapas de interacción de un xenobiótico	11
2.1.2 Metabolismo	12
2.1.3 Citocromos P450	14
2.2 Toxicología genética	16
2.2.1 Alteraciones al material genético	16
2.2.2 Consecuencias de las mutaciones	17
2.3 <i>Drosophila melanogaster</i>	18
2.3.1 Descripción	19
2.3.2 Taxonomía	21
2.3.3 Ciclo de vida	21
2.4 Ensayo SMART	23
III. JUSTIFICACIÓN	28
IV. OBJETIVOS	29
4.1 Objetivo General	29
4.2 Objetivos Particulares	29
V. HIPÓTESIS	30
VI. MATERIALES Y MÉTODOS	31
6.1 Muestra de <i>Tecoma stans</i>	31
6.2 Extractos	31
6.3 Cepas utilizadas	31
6.4 Cruza estándar	32

6.5 Protocolo SMART	32
6.5.1 Tratamiento de las larvas	32
6.5.2 Montaje de las alas	33
6.5.3 Análisis de las preparaciones	34
6.6 Análisis estadístico	35
VII. RESULTADOS	37
7.1 Frecuencia de manchas	37
7.2 Distribución por tamaño de manchas <i>mwh</i>	43
7.3 Manchas <i>flr</i> ³ y gemelas	49
VIII. DISCUSIÓN	50
IX. CONCLUSIONES	55
LITERATURA CITADA	56
SITIOS ELECTRÓNICOS	61
ANEXO	63

RESUMEN

Tecoma stans (L.) Juss. ex Kunth, también conocida como “Tronadora”, es un arbusto endémico del norte, centro y sur de América. En México es utilizada, en la medicina tradicional, como un remedio para tratar la diabetes mellitus tipo II al preparar sus hojas y flores a manera de infusión y emplearlas como agua de uso. El efecto hipoglucémico que presenta ha sido evaluado en distintos modelos *in vivo* (como conejos, ratas y perros); aunque sus efectos genotóxicos no han sido reportados para ninguno de estos. El objetivo de este estudio fue el de evaluar el potencial genotóxico de cuatro extractos obtenidos con disolventes de distinta polaridad (hexano, acetato de etilo, metanol y agua) en la mosca de la fruta, *Drosophila melanogaster*, mediante el ensayo SMART/ala. Esta prueba consiste en la detección y evaluación estadística de alteraciones al nivel de los tricomas del ala de la mosca de la fruta que resultan de la pérdida de la heterocigosis de dos marcadores recesivos (*flr³* y *mwh*) que provienen de diferentes eventos terminales tales como: mutación puntual, pérdida, delección, no disyunción y recombinación mitótica. Los resultados del ensayo de genotoxicidad para los cuatro extractos mencionados (en concentraciones de 0.1, 1 y 10%; más un control concurrente por cada extracto) indican que *T. stans* no induce un efecto genotóxico significativo bajo las condiciones probadas.

Palabras Clave: genotoxicidad, extractos, *Tecoma stans*, diabetes mellitus tipo II, SMART / ala, *Drosophila melanogaster*.

I. ANTECEDENTES

1.1 *Diabetes mellitus.*

El correcto funcionamiento de una célula y, por tanto, de un organismo, depende de la presencia de un conjunto de reacciones químicas que se denominan *metabolismo*. Por medio de éste las células logran proveerse de energía y de elementos estructurales (Rodríguez-Arnaiz, 2003 a). No obstante, cuando una de las reacciones que conforman al metabolismo sufre de alguna alteración (como la ausencia o mala producción de una enzima, por ejemplo) se habla de un *trastorno metabólico*. Actualmente, uno de los trastornos metabólicos que más afectan al ser humano es la diabetes mellitus (D.M.).

En México, la D.M. es conocida como una enfermedad crónica que provoca que los niveles de glucosa en la sangre de un individuo sobrepasen lo normal (hiperglucemia) aun cuando éste se encuentre en ayuno (es decir, que los niveles de glucosa son mayores o iguales a 126mg en un dL de sangre) (sitio electrónico INSP, 2009). Sin embargo, en un sentido más concreto Islas-Andrade y Revilla-Monsalve (2004) definen a la diabetes como una enfermedad genética en la que el paciente sufre de alteraciones metabólicas (al nivel de carbohidratos, grasas y proteínas), al mismo tiempo que padece de una deficiencia relativa o absoluta de insulina, así como de distintos grados de resistencia a esta hormona.

1.1.1 *Causas.*

El desarrollo de la D.M. está relacionado generalmente a factores genéticos (sitio electrónico INSP, 2009), aunque también se reconoce la intervención de factores ambientales (como infecciones virales y agentes químicos superimpuestos) que pueden desencadenar este trastorno (Islas-Andrade y Revilla-Monsalve, 2004). Sin embargo, en la sociedad actual, son la obesidad (o sobrepeso) y la falta de actividad física (o sedentarismo) los principales detonadores de este trastorno (sitios electrónicos INSP, 2009; OMS, 2009 a).

1.1.2 Clasificación.

Debido a la variedad de manifestaciones fenotípicas de la D.M. y a diversos signos y síntomas, ésta se ha clasificado en la categoría de síndrome metabólico (Islas-Andrade y Revilla-Monsalve, 2004). Asimismo, el Grupo Nacional de Datos sobre Diabetes (NDDG, por sus siglas en inglés) del Instituto Nacional de Diabetes y Enfermedades Digestivas y Renales en Estados Unidos reconoce más de dos categorías de la D.M. (sitio electrónico NIDDK, 2009), dentro de las cuales las más utilizadas, y conocidas, son las asignadas como *tipo 1* (o dependiente de insulina) y *tipo 2* (o no dependiente de insulina).

La D.M. tipo 1 se caracteriza por ser una variante en la cual el paciente presenta autoinmunidad. Esto se debe a que los Antígenos Leucocitarios Humanos (HLA, por sus siglas en inglés) desconocen y atacan a las células responsables de la producción de insulina, las células β en el páncreas; al grado de reducir o impedir la secreción de esta hormona (sitio electrónico NIDDK, 2009). Como consecuencia de esto, el paciente requiere de la administración diaria de insulina (de ahí el nombre “dependiente de insulina”) (sitios electrónicos INSP, 2009; NIDDK, 2009; OMS, 2009 a). La población más frecuentemente afectada por este tipo de D.M. son los niños, aunque también puede desarrollarse en personas adultas (sitio electrónico NIDDK, 2009).

Por otro lado, la D.M. tipo 2 es una variante en la que el paciente produce insulina pero el cuerpo es incapaz de utilizarla eficazmente (por ello el nombre “no dependiente de insulina”) (sitio electrónico NIDDK, 2009). Esto último se atribuye a defectos genéticos al nivel de los receptores de insulina, tanto en número como en afinidad (Islas-Andrade y Revilla-Monsalve, 2004). A diferencia de la D.M. tipo 1, la tipo 2 es la variante más común entre los pacientes diabéticos puesto que abarca entre el 90 y 95% de los casos, los cuales están integrados por adultos mayores y personas con problemas de sobrepeso (sitios electrónicos INSP, 2009; NIDDK, 2009; OMS, 2009 a).

1.1.3 Síntomas.

Independientemente del tipo de D.M. que padezca un paciente, los síntomas que distinguen a este trastorno son: producción excesiva de orina (poliuria), sed excesiva (polidipsia), hambre constante (polifagia), pérdida de peso, alteraciones visuales y fatiga (sitios electrónicos INSP, 2009; OMS, 2009 a). No obstante, se reconoce que la aparición de estos síntomas es más notoria en la D.M. tipo 1 que en la tipo 2 dado que el desarrollo de esta última es gradual, por lo que se vuelve evidente cuando ya existen complicaciones que pueden llevar a la muerte (sitio electrónico OMS, 2009 a).

1.1.4 Mortalidad.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) (2009 a, b) calcula que en el mundo hay más de 180 millones de personas diabéticas, y se estima que este número ascenderá hasta los 366 millones para el año 2030 (Wild *et al.*, 2004). Asimismo se reconoce que aproximadamente un 80% de la muertes registradas por este trastorno proceden de países con ingresos medios y se estima, para estos países, que dicho porcentaje todavía aumentará entre los años 2006 y 2015.

Por otra parte, las estadísticas realizadas por el Sistema Nacional de Información en Salud, a partir de las defunciones registradas en el 2007, colocan a la D.M. como la principal causa de mortalidad en México (sitio electrónico SINAIS, 2009).

1.2 Tratamientos tradicionales.

A pesar de ser un trastorno sumamente estudiado a nivel mundial, la D.M. es combatida en México con plantas medicinales y/o sus extractos. Esto se debe a que hay una amplia tradición en el uso de plantas medicinales por parte de la población, sobre todo aquella con bajos recursos económicos que recurre a

curanderos y/o vendedores locales para obtener productos naturales para combatir dicho mal (Andrade-Cetto y Heinrich, 2005).

La relevancia de los tratamientos contra la D.M. llega al punto que la etnofarmacología considera que este trastorno es el vínculo entre la medicina convencional y los tratamientos locales, dado que a partir del análisis de plantas utilizadas en remedios tradicionales se pueden obtener compuestos (como alcaloides, glicósidos, terpenos y flavonoides; entre otros) para generar productos comerciales (Andrade-Cetto y Heinrich, 2005). Sin embargo, para lograr lo previamente mencionado, se requiere conocer del (o los) compuesto(s) en las plantas para después valorar cuánto se requiere del (o los) mismo(s) para obtener el efecto deseado, al mismo tiempo que se evitan los efectos secundarios si es que existen (Ebadi, 2006).

Andrade-Cetto y Heinrich (2005) han documentado al menos el uso de 306 especies de plantas para combatir la D.M. Sin embargo, se estima que esta cifra puede aumentar hasta las 500 especies, en México, si se consideran sólo las plantas que se utilizan para tratar la D.M. tipo 2. Por otro lado, de las plantas documentadas sólo algunas de ellas (y sus respectivos extractos) han sido utilizadas en experimentos con conejos, ratas y ratones para constatar el efecto que tienen en la reducción de la glucosa sanguínea (efecto hipoglucémico).

1.3 *Tecoma stans*.

Entre las 306 especies de plantas que se usan como agentes hipoglucemiantes, Andrade-Cetto y Heinrich (2005) documentan a *Tecoma stans*. Esta planta se describe como un arbusto pequeño, perennifolio o caducifolio, de 1 hasta 20m de alto, con hojas compuestas de folíolos aserrados y lanceolados, que miden de 2.4 a 15cm de largo; inflorescencias en racimo terminal o subterminal (con 20 flores aproximadamente). Las flores de *T. stans* se distinguen por su corola color amarillo vivo tubular-campanulada, que mide de 3 a 5cm de largo (Fig. 1.1) (sitio electrónico CONABIO, 2009).



Figura 1.1. *Tecoma stans*. Fotografías representativas del arbusto (tomada de Lady Bird Johnson Wildflower center, 2009), de las hojas (tomada de Desert-Tropicals, 2009) y de las flores (tomada de Wildflowers of Tucson, Arizona; 2009).

1.3.1 Taxonomía.

La clasificación de *T. stans* es la siguiente:

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Subdivisión: Magnoliophytina

Clase: Magnoliopsida

Subclase: Asteridae

Orden: Escrofulariales

Familia: Bignoniaceae

Género: *Tecoma*

Especie: *Tecoma stans* (L) Juss. ex Kunth (1819)

T. stans también puede ser encontrada bajo las siguientes sinonímias: *Bignonia frutescens* Mill. ex DC., *Bignonia incisa* Hort ex DC., *Bignonia stans* L., *Gelsemium stans* (L.) Kuntze, *Stenolobium incisum* Rose & Standl., *Stenolobium quinquejugum* Loes, *Stenolobium stans* (L.) Seem., *Stenolobium stans* var. *apiifolium* (Hort. ex DC.) Seem., *Stenolobium stans* var. *multijugum* Fr., *Stenolobium stans* var. *pinnatum* Seem., *Tecoma incise* Sweet., *Tecoma stans* var. *apiifolia* Hort. ex DC., *Tecoma tronadora* (Loes.) Johnst (sitio electrónico CONABIO, 2009).

En México, *T. stans* es conocida bajo los nombres de: Tronador, Tronadora, Saúco amarillo, Retama, Lluvia de oro, Corneta amarilla, Campanas amarillas, Palo de arco, Batilimi, Matilimi, Borla de San Pedro, Hierba de San Pedro, Candox, Xk'anlol, Xkantol, Cometa amarillo, Flor de San Pedro, Gloria, Guiabiche, Guie-bacaná, Guie-bichi, Trompeta, Hierba de San Nicolás, Hoja de baño, Ichcuetl, Mixtontze, Ixontli, Lipa-gundoflei, Mazorca, Miñona, Nixtamalxochitl, Caballito, San Pedro, Tulasúchil y X-cantul (sitio electrónico CONABIO, 2009).

1.3.2 Distribución.

T. stans es una planta endémica de América, siendo originaria de México. Actualmente, esta planta se extiende tanto al sur de Estados Unidos (localizándose en los estados de Texas, Florida y Arizona) como hasta el norte de Venezuela y Argentina, pasando por Centroamérica y a lo largo de los Andes. De igual manera, *T. stans* también se distribuye en las Antillas (Fig. 1.2) (sitio electrónico CONABIO, 2009).



Figura 1.2. Distribución de *Tecoma stans* en América (Información de CONABIO, 2009. Dibujo de Marco Antonio Carballo Ontiveros).

En México, *T. stans* se encuentra ampliamente distribuida en prácticamente toda la República y puede ser encontrada en áreas alteradas, orillas de carreteras, faldas de serranías, barrancas y sitios pedregosos. De igual manera, *T. stans* también es cultivada ya que tiene distintos usos como: aromatizante, combustible, material de construcción (su madera), forraje (de ganado bovino y caprino), insecticida (contra el gusano cogollero del maíz), y para artículos torneados y de carpintería; aunque su uso más sobresaliente es el medicinal (para tratar la diabetes y enfermedades hepáticas, urinarias, respiratorias, ginecológicas, cardíacas, gastrointestinales y epidérmicas) (sitio electrónico CONABIO, 2009). Cabe señalar que el uso medicinal de *T. stans* es a partir de la preparación de sus hojas y flores a manera de infusión y emplearlas como agua de uso (Andrade-Cetto y Heinrich, 2005; Andrade-Cetto *et al.*, 2006).

1.3.3 Compuestos activos.

De acuerdo a la CONABIO (2009), se han reportado hasta la fecha 56 componentes químicos en *T. stans*. Sin embargo, el (o los) compuesto(s) responsable(s) del efecto hipoglucémico de esta planta no se ha(n) podido determinar con exactitud puesto que se han realizado estudios con algunos, entre ellos cuatro alcaloides: Tecomina, Tecostanina, 5 β -Hidroxiskitantina (anteriormente conocida como Base C) y Boschniakina (Fig. 1.3) (Costantino *et al.*, 2003 a, b); sin obtener un resultado positivo. Actualmente, Aguilar-Santamaría y colaboradores (2009) proponen que los responsables de tal efecto son los compuestos fenólicos, en particular el ácido clorogénico, presente en *T. stans* (Fig. 1.3).

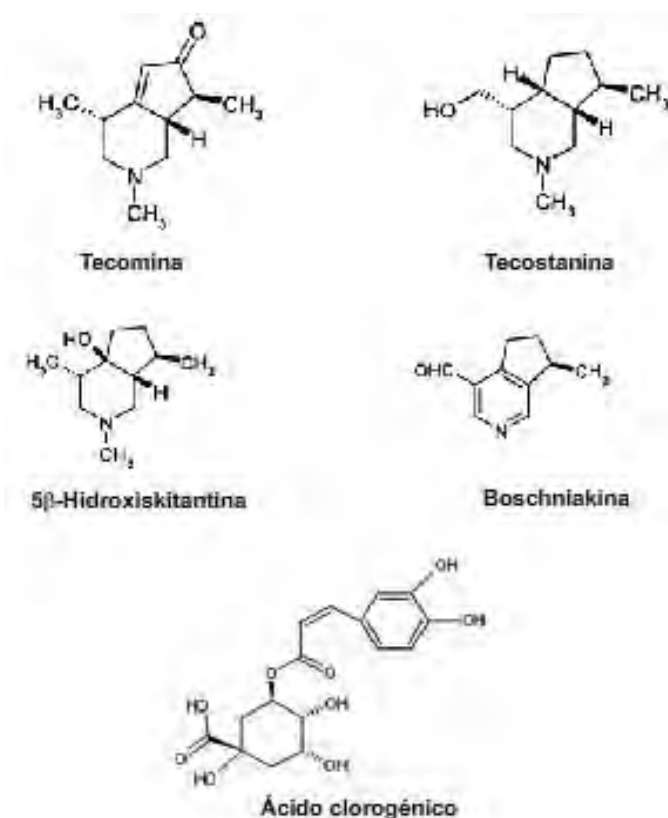


Figura 1.3. Compuestos químicos de *T. stans*: Tecomina, Tecostanina, 5 β -Hidroxiskitantina, Boschniakina (modificados de Costantino *et al.*, 2003 b), y ácido clorogénico (tomado de ITM Online, 2009).

1.3.4 Toxicidad.

Estudios realizados con modelos biológicos *in vivo* muestran que los extractos acuosos de *T. stans* no son tóxicos tanto en perros (Loyoza-Meckes y Mellado-Campos, 1985) y conejos normales (Román-Ramos *et al.*, 1991) como en ratas normales y diabéticas inducidas con estreptozotocina (Aguilar-Santamaría *et al.*, 2009).

II. INTRODUCCIÓN

2.1 Toxicología.

Se define como el estudio de agentes físicos, químicos o biológicos que se caracterizan por producir un efecto nocivo cuando entran a un sistema biológico, dañando sus tejidos, órganos y procesos (Kamrin, 1990; Manahan, 2003; Rodríguez-Arnaiz, 2003 a). En el caso particular de los agentes químicos, los compuestos foráneos que entran a un organismo reciben el nombre de *xenobióticos* y se caracterizan por no ser utilizables en los ciclos generadores de energía ni en las reacciones de síntesis (Vega, 1985).

2.1.1 Etapas de interacción de un xenobiótico.

De acuerdo a Vega (1985), las diferentes etapas de interacción que presenta un xenobiótico al entrar en un organismo son:

- Exposición: Es cuando un organismo se encuentra en contacto con un xenobiótico, en diferentes medios: aire, agua y alimentos, entre otros.
- Absorción: Ingreso del xenobiótico al organismo a través de diversas vías: (i) respiratoria (inhalación), (ii) tegumentaria (absorción por la piel y mucosas) y (iii) gastrointestinal (ingestión). Posteriormente, el xenobiótico pasa a la circulación sistémica (sangre).
- Distribución: El xenobiótico se distribuye a los tejidos del organismo en donde, dependiendo de las características tanto del xenobiótico como del tejido, es absorbida, metabolizada y retenida y/o eliminada.
- Eliminación: El organismo tiende a excretar el xenobiótico a través de: las vías urinarias, el intestino y por conjugación enzimática.

- Acumulación: Dependiendo de las características físico-químicas del xenobiótico, éste puede interactuar con las macromoléculas de las células, fijarse en los tejidos y acumularse en estos últimos.

En la Figura 2.1 se ejemplifica el paso de sustancias a través de las etapas de interacción de un xenobiótico previamente mencionadas.

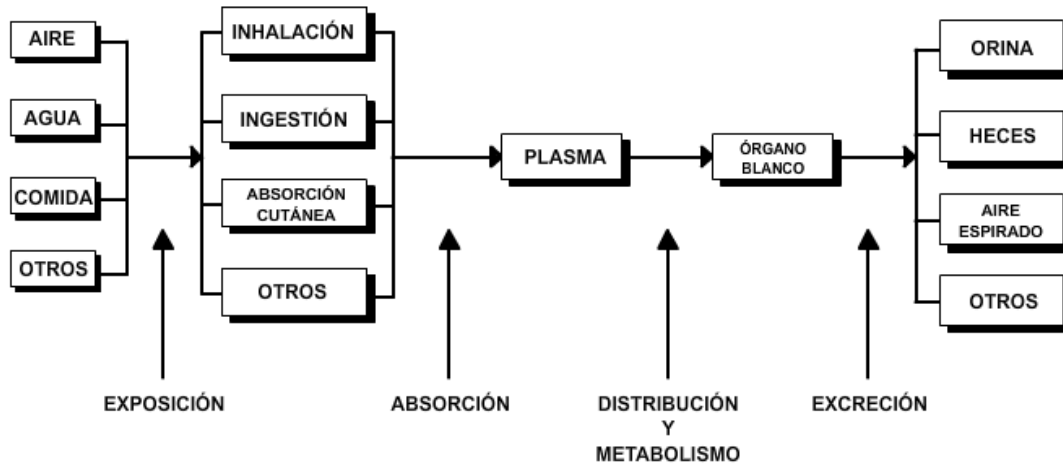


Figura 2.1. Representación esquemática de las etapas de interacción entre una sustancia xenobiótica y un organismo animal (tomado de Vega, 1985).

2.1.2 Metabolismo.

Cuando un xenobiótico pasa por la etapa de absorción, éste entra en contacto con las células del organismo. Como respuesta a esta interacción, las células hacen uso de las enzimas de las que están provistas (que normalmente emplean en diferentes rutas metabólicas) (Rodríguez-Arnaiz, 2003 a) para hacer frente al xenobiótico metabolizándolo (Vega, 1985). A este proceso se le denomina *biotransformación*.

Por lo general, la biotransformación de un xenobiótico resulta en una forma menos activa del mismo y más hidrosoluble para su excreción (*biodegradación*). Sin embargo, pueden suceder que la biotransformación genere una forma más activa del xenobiótico (*bioactivación*), la cual es capaz de producir daño a los tejidos, despertar reacciones inmunológicas e interactuar con el material genético (DNA) (Fig. 2.2) (Rodríguez-Arnaiz, 2003 a).

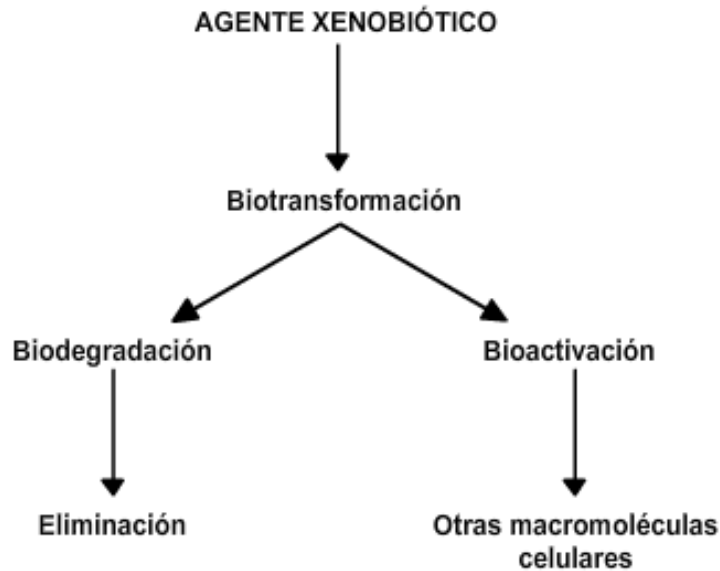


Figura 2.2. Esquema de la biotransformación metabólica (tomado de Rodríguez-Arnaiz, 2003 a).

Para que un xenobiótico sea biontransformado es importante que éste pase por dos fases. La *fase I* o *Fase Presintética* corresponde a las reacciones de hidrólisis, reducción y oxidación que experimenta un xenobiótico como un primer intento para hacerlo más hidrosoluble y, así, ser excretado de un organismo (en esta fase intervienen principalmente el sistema enzimático de los citocromos P450). De lo contrario, éste (ya como metabolito) pasa a la *fase II* o *Fase Sintética*, donde experimenta reacciones de conjugación con compuestos como: ácido glucorónico (formando glucorónidos), péptidos, sulfatos, y otros; que terminan transformándolo en un conjugado (estable e hidrosoluble) para excretarlo definitivamente (en esta fase intervienen diversas enzimas como las glutatión transferasas) (Vega, 1985; Rodríguez-Arnaiz, 2004).

Las enzimas que participan en las reacciones de las fases de biotransformación se localizan en el citoesqueleto, en el citosol, retículo endoplasmático liso y en las mitocondrias de las células. En el caso particular de los mamíferos, la biotransformación tiene lugar principalmente en el hígado, aunque también se ha demostrado la actividad de enzimas de biotransformación en los pulmones, riñones, intestinos, nódulos linfáticos, piel, médula ósea, cerebro, glándulas mamarias, ovarios y testículos (Vega, 1985; Rodríguez-Arnaiz, 2003 a).

2.1.3 Citocromos P450

Conocidas también como *enzimas de función mixta*, *monoxigenasas polisustrato*, *oxidases microsomales* y *proteínas hemotiolato* (Rodríguez-Arnaiz, 2004); los citocromos P450 pertenecen a una súper-familia de isoenzimas (Vega, 1985). Estas moléculas reciben su nombre por haber sido detectadas junto al pigmento citocromo b₅ (P) en muestras de microsomas de hígado, en bandas de absorción de 450nm en el espectro de Soret (Rodríguez-Arnaiz, 2004).

Aunque estructuralmente, los citocromos P450 se componen de una parte proteica (apoproteína) y un grupo hemo prostético (Fig. 2.3), lo que los distingue es su gran variedad de parámetros cinéticos y propiedades de regulación, ya que les confiere la posibilidad de reaccionar con una gran variedad de sustratos (los cuales exceden en número los 200,000), entre los que destacan los agentes terapéuticos y los xenobióticos (Coon *et al.*, 1996; Rodríguez-Arnaiz, 2004). La interacción con este tipo de compuestos consiste en su biotransformación en formas hidrosolubles para ser excretadas con mayor facilidad. Esto lo logran los citocromos P450 al insertar un átomo de oxígeno molecular al sustrato con el que se encuentra interactuando (mientras el segundo átomo de oxígeno se reduce con la formación concomitante de agua) (Rodríguez-Arnaiz, 2004).

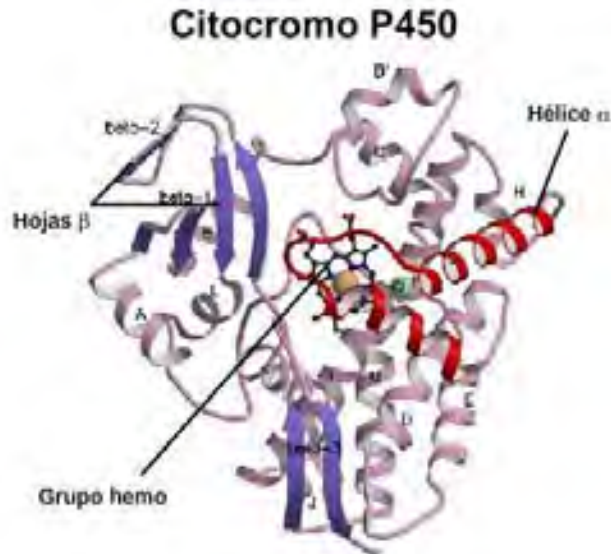


Figura 2.3. Estructura de los citocromos P450 (tomado y modificado de Division of Structural Biology / Life Science Research Center, 2009).

Dada la variedad de isoenzimas que integran a la súper-familia de citocromos P450 es necesaria su identificación a partir de una nomenclatura. Ésta consiste en el prefijo “CYP” seguido de un número arábigo que designa a la familia, luego una letra que señala la subfamilia y, por último, un segundo número que denota un gen individual. Para distinguir la nomenclatura de los genes de los citocromos P450 y de las enzimas, la primera se escribe en cursivas mientras que la segunda se escribe en mayúsculas (Tijet *et al.*, 2001; Rodríguez-Arnaiz, 2004). De esta manera es posible identificar las familias de citocromos P450, las que pueden resultar distintivas para ciertos organismos, como las CYP6 que son exclusivas de los insectos; o bien, las que son compartidas entre distintos grupos, como las CYP4 que están presentes tanto en los insectos como en los vertebrados (Tijet *et al.*, 2001; Rodríguez-Arnaiz, 2004).

Los citocromos P450 se localizan en las membranas del retículo endoplasmático liso y de las mitocondrias. Al nivel del organismo, su actividad se ha observado en prácticamente todos los tejidos; aunque existen órganos en donde la actividad de estas isoenzimas es más marcada. Por ejemplo, en el caso de los vertebrados se ha constatado que la actividad de los citocromos P450 son más elevadas en el hígado, pulmón, riñón, ovarios, testículos, glándulas suprarrenales y placenta;

mientras que en los insectos dicha actividad es evidente en los cuerpos grasos pericuticulares, en el intestino medio y en los tubos de Malpigio (Rodríguez-Arnaiz, 2004).

2.2 Toxicología genética.

Para comprender los mecanismos celulares y moleculares que subyacen a un evento toxicológico al nivel de un organismo, la toxicología se divide en varias subespecialidades (Brusick, 1987). Una de ellas es la *toxicología genética*, la cual se define como la disciplina que trata del estudio y caracterización de agentes físicos y químicos que interactúan con el DNA de los organismos (compuestos genotóxicos), produciendo efectos hereditarios desde deletéreos hasta letales (Casciano, 1991; Rodríguez-Arnaiz, 2003 a).

2.2.1 Alteraciones al material genético

Desde 1901 se sabe que el concepto de *mutación*, propuesto por Hugo de Vries (Rodríguez-Arnaiz, 2003 a, Tamarin, 2004), hace referencia al cambio o alteración que sufre la información hereditaria (DNA, gen o cromosoma) (Levine, 1974; Barahona y Piñero, 2002; Tamarin, 2004). Dicho cambio puede ser producto del azar (Barahona y Piñero, 2002), o bien, por la acción de agentes físicos (radiaciones ionizantes) y químicos (gas mostaza) como lo demostraron Herman Müller (1927) y Charlotte Auerbach (1942), respectivamente (Rodríguez-Arnaiz, 2003 a).

Las mutaciones se clasifican de acuerdo al nivel en el que se presenta la alteración en el material genético, en:

- Microlesiones: cuando las mutaciones se presentan a nivel molecular con alteraciones en la secuencia del DNA (como sustitución o adición/delección de pares de bases). También son conocidas como *mutaciones puntuales* o *mutaciones de un solo gen* (Brusick, 1987; Casciano, 1991).

- **Macrolesiones:** cuando las mutaciones implican cambios estructurales (ruptura, delección, rearrreglos) o numéricos (aneuploidías y poliploidías) al nivel de los cromosomas. También son conocidas como *mutaciones de locus múltiples* o *aberraciones cromosómicas* (Brusick, 1987; Casciano, 1991).

2.2.2 Consecuencias de las mutaciones

Dependiendo del tipo de célula donde se produzca una mutación por acción de un compuesto genotóxico, las consecuencias de dicho evento cambiarán notablemente de un individuo a una población (Rodríguez-Arnaiz, 2003 a). Si la mutación se presenta en las células germinales de un organismo, ésta puede provocar la esterilidad del individuo o, si se fija, alteraciones genéticas que se transmiten a otras generaciones (*mutagénesis*). En cambio, si la mutación se presenta en células somáticas se pueden tener dos situaciones: 1) donde se altera la maquinaria celular, ocasionando enfermedades o la aparición de cánceres (*carcinogénesis*), o 2) defectos en el nacimiento si las células afectadas pertenecen a un embrión en desarrollo (*teratogénesis*) (Fig. 2.4) (Brusick, 1987; Rodríguez-Arnaiz, 2003 a).

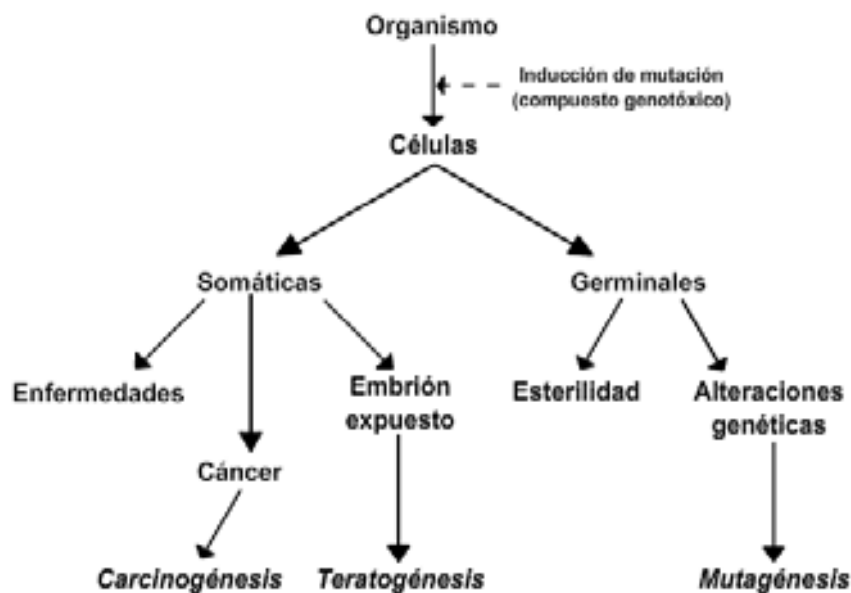


Figura 2.4. Consecuencias de las mutaciones en las células de un organismo (tomado y modificado de Rodríguez-Arnaiz, 2003 a).

La preocupación sobre la exposición del hombre a compuestos genotóxicos y, sobre todo, a las consecuencias que estos traen consigo fue lo que impulsó al genetista Joshua Lederberg, en 1962, a realizar estudios genéticos para valorar si una variedad de sustancias químicas representaban o no un riesgo para las células humanas. Gracias a estos estudios y a las propuestas hechas por Lederberg, la realización de pruebas toxicológicas se convirtió en una medida de protección necesaria para las industrias antes de producir y vender un producto al público (Rodríguez-Arnaiz, 2003 a). Cabe señalar que el éxito de dicha medida radica de igual manera en el uso de modelos animales de los que se cree que exhiben una respuesta tóxica similar a la de los seres humanos, bajo condiciones de exposición relevantes para estos últimos (Brusick, 1987). Un ejemplo de estos modelos animales es precisamente *Drosophila melanogaster*.

2.3 *Drosophila melanogaster*

Desde los trabajos realizados por el investigador estadounidense Thomas Hunt Morgan en 1909, *Drosophila melanogaster* ha sido reconocida como un modelo idóneo para el estudio de un gran número de aspectos biológicos. Su importancia radica en que se conoce ampliamente su genética y genoma, su posición filogenética en un marco evolutivo amplio, por las ventajas que ofrece su mantenimiento en el laboratorio (como su tamaño, su ciclo de vida corto, el espacio donde puede ser cultivada, y el número de descendientes que se pueden obtener en poco tiempo) (Rodríguez-Arnaiz, 2003 b), y por la versatilidad que representa el contar con un gran número de cepas mutantes lo que ha permitido la elaboración de un gran número de ensayos que han desvelado fenómenos tales como la determinación de la herencia ligada al sexo y la identificación de actividades metabólicas diversas que son capaces de activar promutágenos y procancerígenos (Graf *et al.*, 1984, Dunkov *et al.*, 1996); o bien, otras alteraciones de tipo metabólico, ya que sus funciones son similares a la de los humanos (Rodríguez-Arnaiz, 2003 b).

Para la toxicología genética, *D. melanogaster* ha constituido un modelo idóneo para evaluar el efecto de múltiples compuestos xenobióticos. Esto se debe a que este organismo cuenta con cerca de 4,000 genes que producen un efecto fenotípico (Lindsley y Zimm, 1992), los cuales pueden servir de marcadores para realizar análisis cualitativos y cuantitativos al detectar su pérdida o aparición por efecto de mutaciones, deleciones o recombinaciones mitóticas resultantes de la exposición de un xenobiótico. Los ensayos más utilizados para realizar este tipo de pruebas son:

- 1) El ensayo de mutaciones letales recesivas ligadas al sexo (SLRLT),
- 2) La prueba de no disyunción y pérdida de cromosomas sexuales (SCLT), y
- 3) Los ensayos de mutación somática y recombinación mitótica, en sus modalidades de ojo y ala (SMART) (Rodríguez-Arnaiz, 2003 b).

2.3.1 Descripción.

Al ser un insecto, *D. melanogaster* se caracteriza por presentar tres tagmas, que son: cabeza, tórax y abdomen; los cuales están cubiertos por un exoesqueleto. Asimismo presenta un par de antenas, tres pares de patas y un solo par de alas funcionales, ya que su segundo par se ha transformado en órganos de equilibrio, que reciben el nombre de halterios o balancines. Sus alas son distintivas puesto que cuentan con cerdas y venas. Además en esta especie es evidente la existencia de dos interrupciones en la vena costal (Fig. 2.5) (Meigen, 1830). Su tamaño adulto es aproximadamente de 3mm (Ruiz-Esparza, 2006) y presenta dimorfismo sexual (Demerec y Kaufmann, 1962).

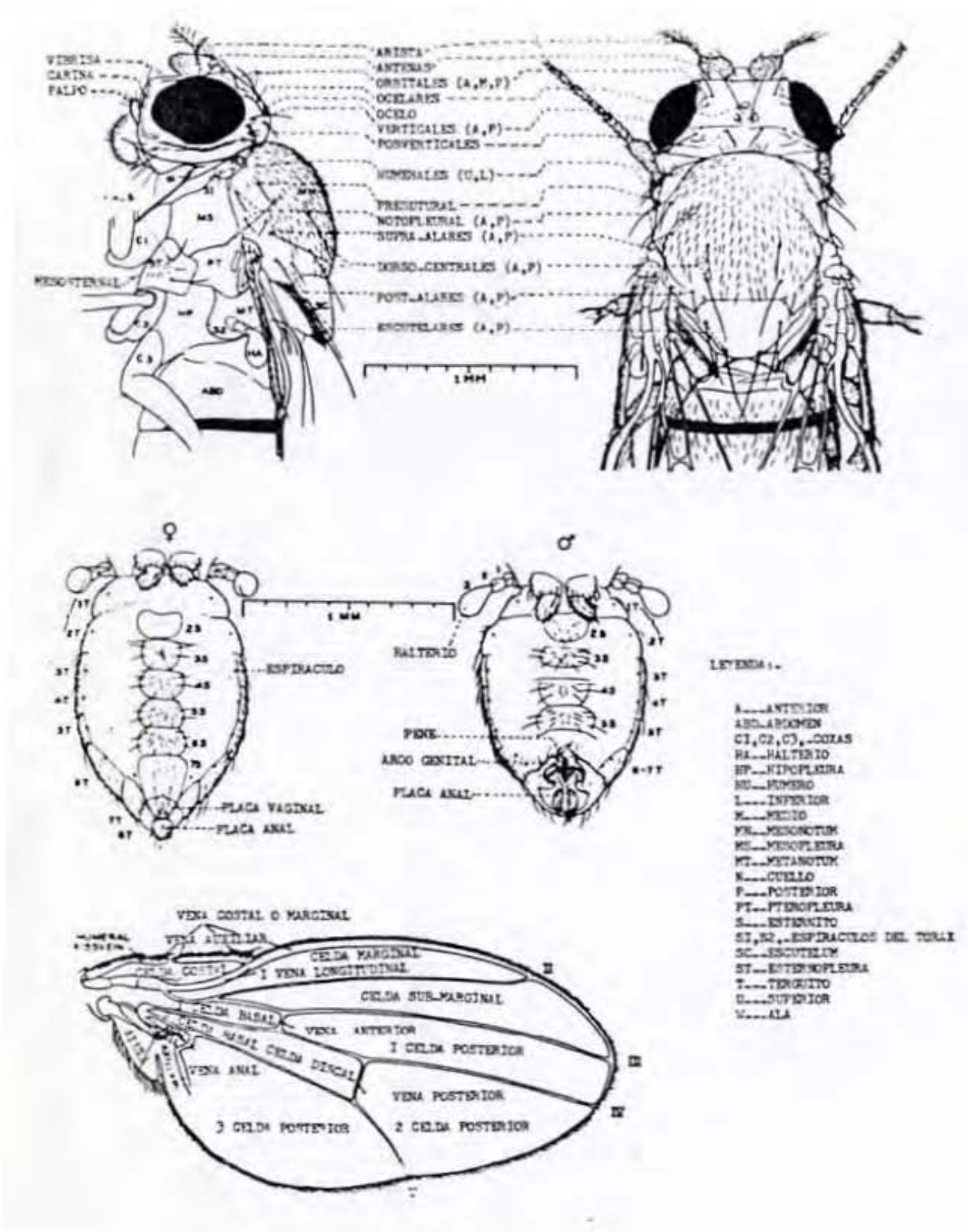


Figura 2.5. Morfología de *Drosophila melanogaster* (tomado de Demerec y Kaufmann, 1962).

2.3.2 Taxonomía.

La clasificación de *D. melanogaster* es la siguiente:

Reino: Animalia

Phylum: Arthropoda

Subphylum: Hexapoda

Clase: Insecta

Subclase: Pterygota

Orden: Diptera

Familia: Drosophilidae

Género: *Drosophila*

Especie: *Drosophila melanogaster* (Meigen, 1830)

D. melanogaster es conocida bajo el nombre común de “la mosca de la fruta”, aunque también lo es como “la mosca del vinagre” (Rodríguez-Arnaiz *et al.*, 2005).

2.3.3 Ciclo de vida.

Al ser *D. melanogaster* un organismo holometábolo, éste pasa por todos los estadios de metamorfosis de un insecto, los cuales consisten en: huevo, larva, pupa y adulto o imago (Rodríguez-Arnaiz *et al.*, 2005). La vida de una nueva mosca inicia con la oviposición de un huevo (~0.5mm de longitud y de color blanco lechoso) por parte de una hembra para convertirse en una larva, 24h después. La larva se caracteriza por sufrir dos mudas (en un intervalo de 48h), por lo que este periodo en el ciclo de vida consta de tres estadios (L1, L2 y L3). Después de 48h en la L3 (donde el organismo mide ~4.5mm), se da paso a la pupa, en el cual *D. melanogaster* invierte 120h para, finalmente, transformarse en un adulto o imago (Fig. 2.6). En resumen, la duración del ciclo se estima en 10 días cuando *D. melanogaster* se encuentra a 25°C. Sin embargo, dependiendo de la temperatura este ciclo puede variar (Demerec y Kaufmann, 1962; Ashburner, 1989).

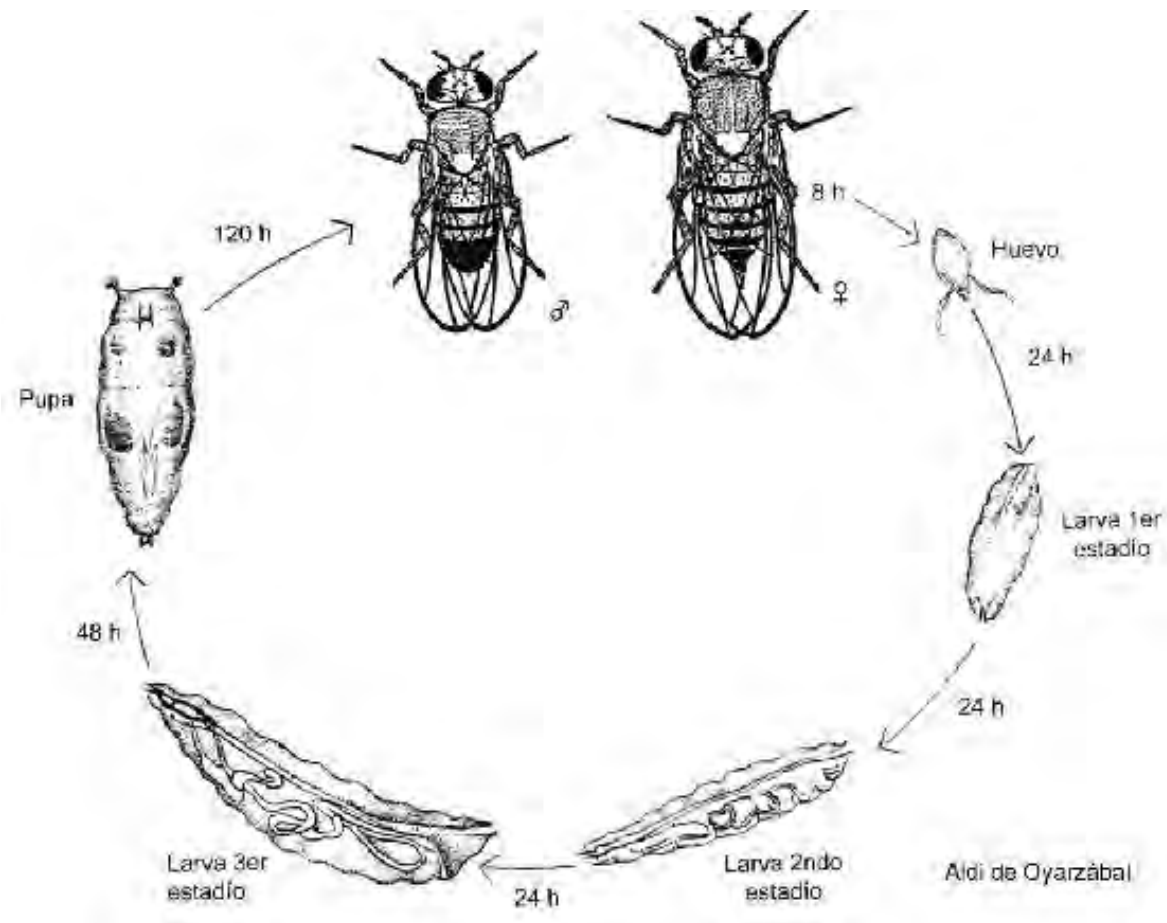


Figura 2.6. Ciclo de vida de *Drosophila melanogaster* (tomado de Rodríguez-Arnaiz, 2005).

Cabe señalar que dentro del estadio larvario es posible observar la existencia de dos estirpes celulares: una que corresponde al tejido larvario y otra que está integrada por las células de los discos imaginales. Éstas últimas se distinguen por su tamaño pequeño y apariencia indiferenciada, y por su proliferación a un ritmo diferente al de las células larvarias a través del desarrollo; además es a partir de ellas de dónde se originarán estructuras tales como ojos, patas, alas y otras que forman parte de los adultos de las moscas (Fig. 2.7) (Shearn y Garen, 1974; Russell, 1992).

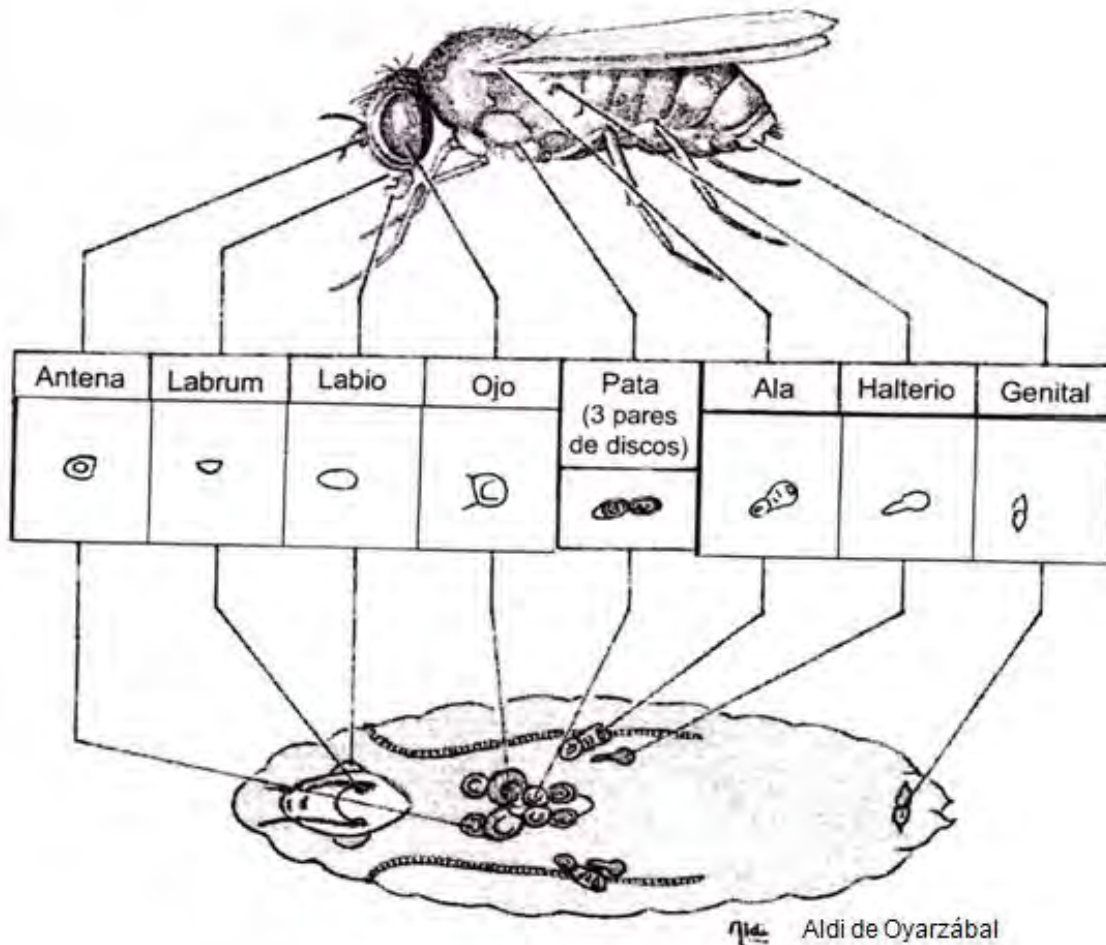


Figura 2.7. Discos imaginales y estructuras a las que dan origen en el adulto (Rodríguez-Arnaiz *et al.*, 2005).

2.4 Ensayo SMART

El ensayo de mutación y recombinación somática (SMART, por sus siglas en inglés) consiste en la exposición de larvas (discos imaginales) de una generación de moscas a un xenobiótico. Esto se realiza con el objetivo de determinar si dicho compuesto es capaz de interactuar con el material genético de las moscas, alterando, de esta manera, su genotipo mediante los siguientes eventos: mutación puntual, delección, no disyunción, aneuploidías y recombinaciones mitóticas. El resultado de dichas alternaciones se manifiesta fenotípicamente en el cuerpo de las moscas adultas con la presencia de *clones* o células afectadas, las cuales se pueden detectar mediante el uso de marcadores genéticos (Graf *et al.*, 1984; Rodríguez-Arnaiz, 2003 b).

SMART cuenta con dos modalidades: ojo y ala, dependiendo del que se elija se hace uso de distintos marcadores para su realización. En el caso de SMART / ala, los marcadores a utilizar son *flr³* y *mwh*; los cuales se expresan al nivel de los tricomas del ala de *D. melanogaster* (Fig. 2.9) (Graf *et al.*, 1984).

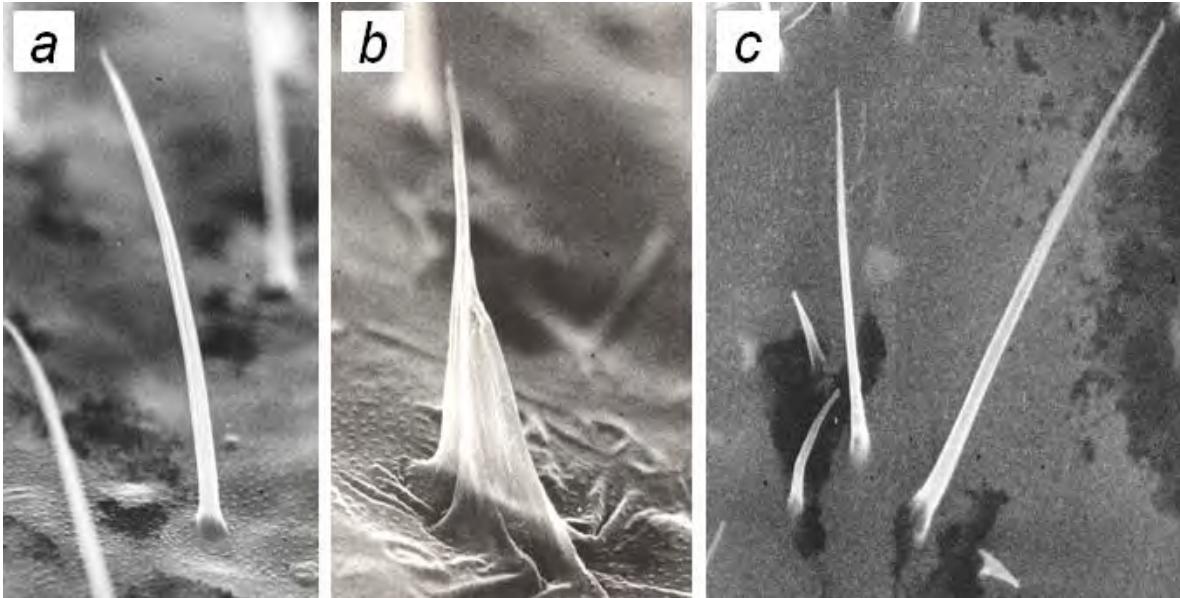


Figura 2.9. Micrografías electrónicas de: a) tricomas normales del ala de la mosca, b) tricomas con el fenotipo *flr³*, y c) tricomas con el fenotipo *mwh* (Donadas al Laboratorio de Genética por el Dr. U. Graf, 1992).

La Figura 2.10 muestra los eventos genéticos a partir de los cuales se pueden expresar los marcadores utilizados en este ensayo.

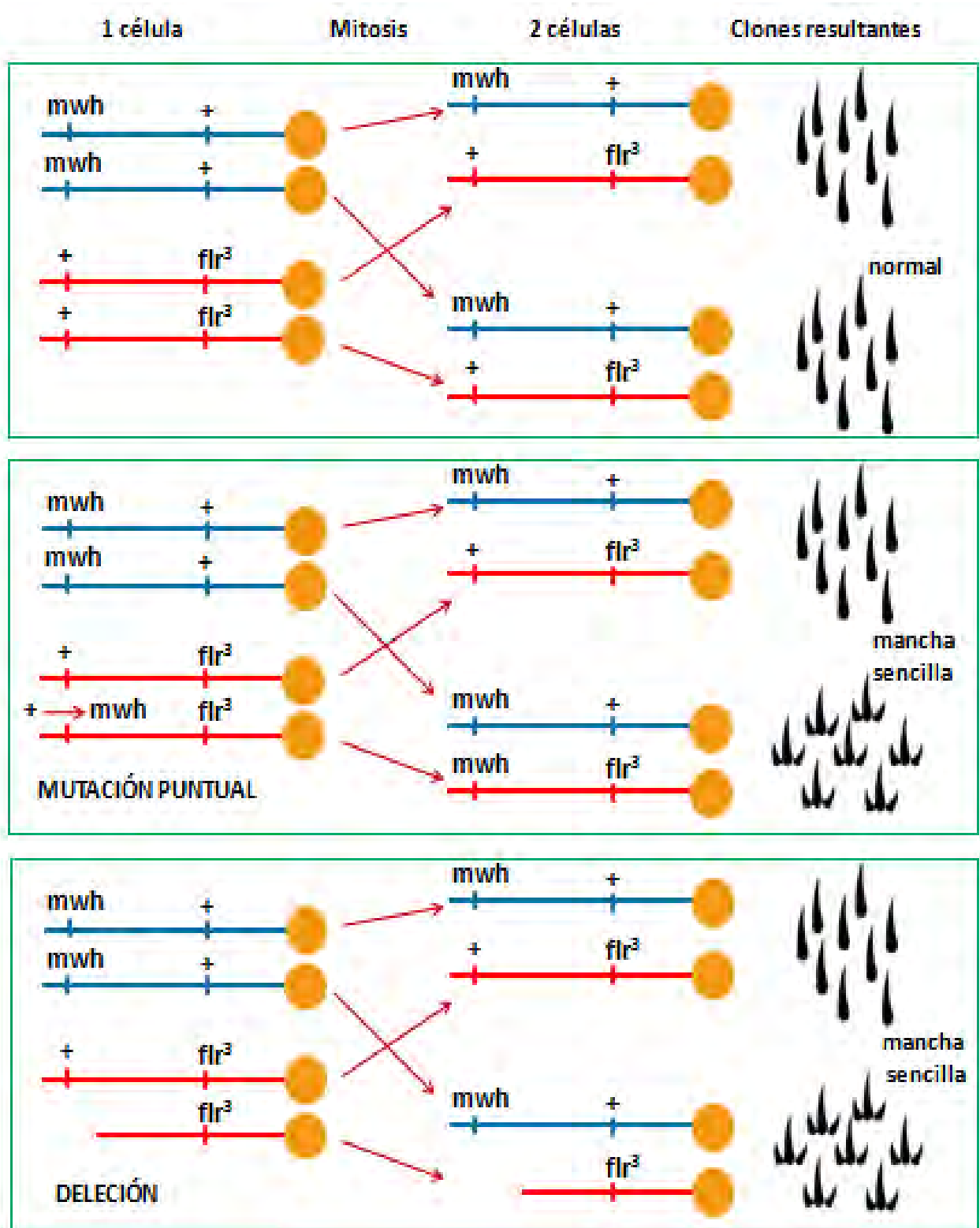


Figura 2.10. Eventos genéticos que contempla el ensayo de mutación y recombinación somática (SMART) (tomado y modificado de Graf *et al.*, 1984).

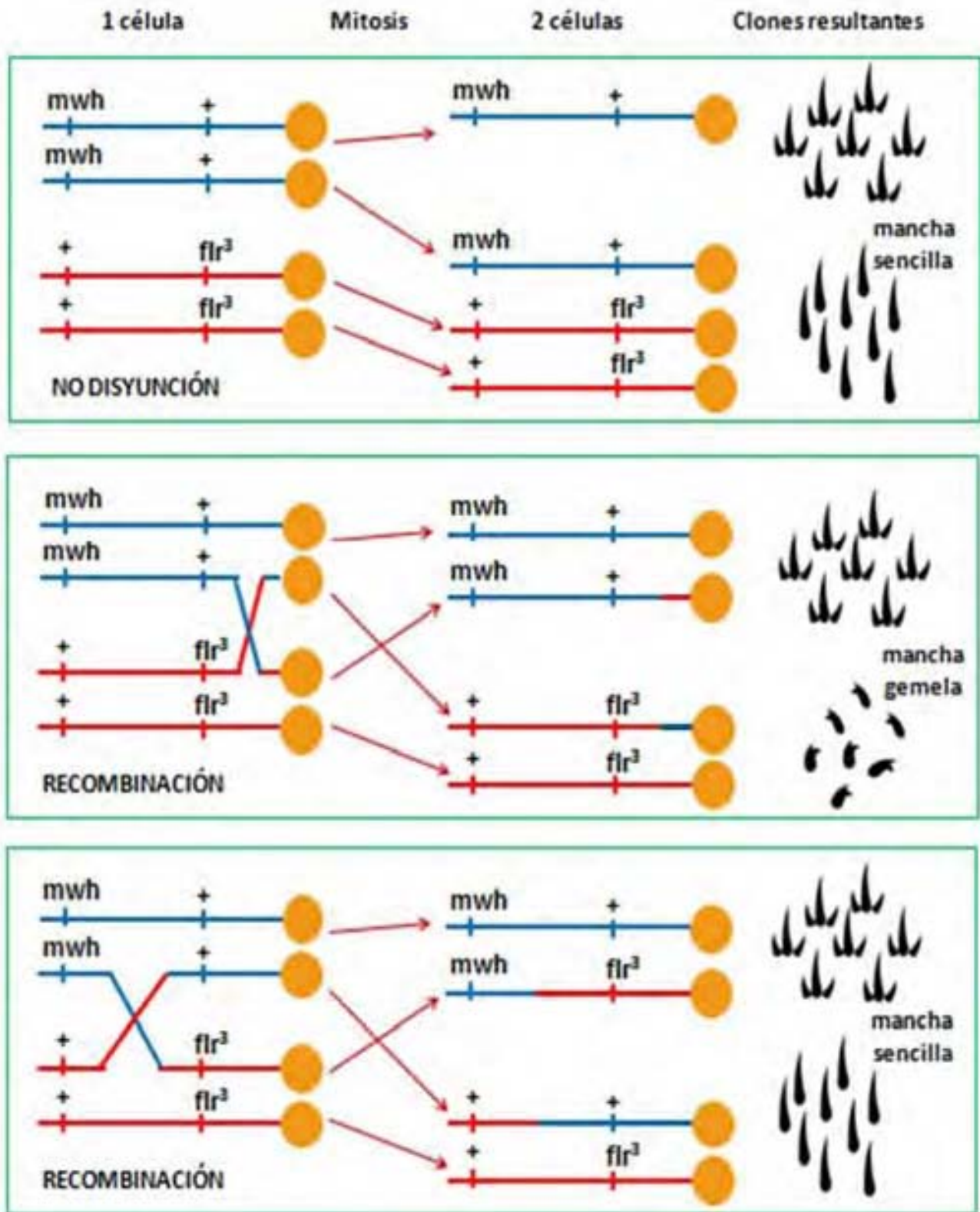


Figura 2.10. Continuación de los eventos genéticos que contempla el ensayo de mutación y recombinación somática (SMART) (tomado y modificado de Graf *et al.*, 1984).

A diferencia de otros ensayos para evaluar el potencial genotóxico de un compuesto, SMART / ala cuenta con la posibilidad de: 1) hacer estudios donde se puede vincular la actividad recombinogénica de un compuesto con su carcinogenicidad, 2) realizar preparaciones permanentes de alas con las que se puede hacer la verificación y reconsideración de un estudio en cualquier momento, 3) almacenar las moscas de un estudio en alcohol al 70% para después realizar el montaje de alas, y 4) realizar el estudio de 25,000 células por ala (Graf *et al.*, 1984). En resumen, esto hace de SMART / ala un ensayo sensible, rápido, confiable y de bajo costo con el que se puede realizar el estudio de un gran número de compuestos químicos y mezclas complejas (Graf *et al.*, 1984, 1989; Graf y van Schaik, 1992; Rodríguez-Arnaiz *et al.*, 1996).

III.JUSTIFICACIÓN

La D.M. es el trastorno endócrino más común en el mundo y de acuerdo a la OMS (2009 b) es la 12° causa de muerte por enfermedad a nivel mundial. Asimismo se estima que para el año 2030 el número de personas que padecen este mal ascenderá al punto de colocarla en la 7° posición. En este aspecto, México registrará un aumento en su población de aproximadamente 6 millones de pacientes para el 2030 (Andrade-Cetto *et al.*, 2006), además de que la D.M. se ha colocado como la principal causa de muerte en el país (sitio electrónico SINAIS, 2009).

Esto deja en claro que el tratamiento de la D.M. en México es un tema de relevancia y más por la existencia de personas, que al carecer de recursos para atenderse en centros de salud certificados, retoman el uso de tratamientos tradicionales a base de extractos de plantas mexicanas para combatirla (Andrade-Cetto y Heinrich, 2005). Es por ello que son de importancia estudios relativos a la exposición de los extractos de dichas plantas, como lo es en el caso de *Tecoma stans*.

Una forma de realizar dichos estudios es a partir del ensayo SMART / ala, el cual permite evaluar el potencial genotóxico de xenobióticos haciendo uso del organismo modelo *Drosophila melanogaster* (Graf *et al.*, 1984).

IV. OBJETIVOS

4.1 Objetivo General.

- Determinar si cuatro extractos de *Tecoma stans*, de diferente polaridad, presentan un efecto genotóxico en el ensayo SMART/ala de *Drosophila melanogaster*.

4.2 Objetivos Particulares.

- Determinar si los extractos de *T. stans* requieren metabolizarse para inducir daño genético en las células somáticas de *Drosophila melanogaster*.
- Determinar si existe una correlación entre la frecuencia de manchas y las concentraciones utilizadas.
- Determinar si existe una diferencia estadísticamente significativa entre las series tratadas y sus respectivos controles.
- Aportar evidencia sobre la genotoxicidad de *Tecoma stans* para futuros estudios.

V. HIPÓTESIS

H₀: Los extractos de *Tecoma stans* no presentan un efecto genotóxico, dado que la frecuencia de manchas entre las series tratadas y sus respectivos controles no es estadísticamente significativa.

H_A: Los extractos de *Tecoma stans* presentan un efecto genotóxico, lo que implica que la frecuencia de manchas en las series tratadas es estadísticamente significativa con respecto a los controles.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Muestra de Tecoma stans.

La muestra utilizada procede del mercado local de Tuxtla Gutiérrez, Chiapas.

6.2 Extractos.

Para evaluar el potencial genotóxico de *T. stans* se emplearon cuatro extractos de esta planta, los cuales se realizaron con: hexano, acetato de etilo, metanol e infusión. Estos se obtuvieron por dos diferentes métodos (ver *Información técnica*, ANEXO).

6.3. Cepas utilizadas.

Se utilizaron dos cepas de *Drosophila melanogaster*, éstas son:

- *flr*³ (“flare”), y
- *mwh e* (“multiple wing hairs” y “ebony”)

La cepa *flr*³ se caracteriza por ser genotípicamente heterocigota (*flr*³ / TM3, *Bd*^S). Esto se debe a que la mutación *flr*³ (localización: 3-38.8), que se expresa a nivel de los tricomas del ala de *D. melanogaster* en forma de “flamas”, es letal en condición homocigota. Por esta razón se emplea el balanceador TM3, ya que permite la viabilidad en este tipo de individuos al presentar múltiples inversiones que impiden la recombinación con su cromosoma homólogo. Además, dicho balanceador cuenta con el marcador *Bd*^S, el cual se expresa fenotípicamente como alas con borde aserrado, lo cual posibilita seleccionar a las moscas que presentan al TM3 (Lindsley y Zimm, 1992).

Por otro lado, la cepa *mwh e* se caracteriza por ser genotípicamente homocigota para las dos mutaciones. La mutación *mwh* (localización: 3-0.3) es recesiva y se expresa como más de un tricoma por célula del ala de la mosca (generalmente tres tricomas). De igual forma, el marcador *e* (localización: 3-70.7) es una mutación recesiva y se distingue por conferirle un color negro brillante al cuerpo de la mosca (Lindsley y Zimm, 1992).

6.4 Cruza estándar.

Las larvas que se emplearon para los tratamientos son de la primera generación filial (F₁) de una craza realizada entre hembras vírgenes *flr³ / TM3, Bd^S* con machos *mwh e / mwh e*. A esta craza se le denomina *estándar* (ST) porque los individuos manejados no sobreexpresan las enzimas *CYP450*.

6.5 Protocolo SMART.

El protocolo que se siguió es el establecido por Graf y sus colaboradores (1984), siendo la única variante en éste el manejo de la cepa *mwh e* en machos para realizar la craza ST. La F₁ que se obtuvo de dicha craza fue a partir de la sincronización de ésta última, en frascos con medio de cultivo y con levadura fresca (ver *Información técnica*, ANEXO), por un intervalo de 6h. Transcurrido este tiempo se retiraron los progenitores y se permitió el desarrollo de la F₁ en larvas transheterocigotas con una edad de 72 ± 3h. Las larvas se recolectaron de los frascos con una solución de sacarosa al 20% y una malla. Posteriormente, éstas se lavaron con agua de la llave para ser sometidas al tratamiento con los extractos.

6.5.1 Tratamiento de las larvas.

Las larvas recolectadas se colocaron en viales de polipropileno (ver *Información técnica*, ANEXO) para ser tratadas con los extractos de *T. stans* de forma crónica. Por cada extracto se emplearon cantidades que corresponden al 0.1, 1 y 10% de

la mezcla utilizada para hidratar 1g de medio instantáneo para *Drosophila* (Carolina Biological Supply Company; Burlington, NC. Producto #173200) (ver *Información técnica*, ANEXO). Asimismo se utilizó un control por cada extracto, el cual fue preparado con su disolvente correspondiente (ver *Información técnica*, ANEXO).

Por cada tratamiento se realizó una réplica y se permitió que las larvas alcanzaran el estadio adulto para después proceder con su inmediata fijación utilizando etanol al 70%.

6.5.2 Montaje de las alas.

Se separaron los adultos fijados de acuerdo a los siguientes fenotipos: 1) moscas con alas silvestres ($mwh\ e + / + flr^3$) y 2) moscas con alas aserradas ($mwh\ e + / TM3, Bd^S$). Esto se hizo para emplear sólo a las moscas con alas silvestres, ya que en ellas tienen lugar todos los eventos genéticos por los que se pueden expresar flr^3 , mwh o ambos; ya que las moscas con alas aserradas son reservadas para determinar con exactitud si los procesos recombinogénicos son los responsables de un efecto genotóxico puesto que en ellas se elimina todo proceso de recombinación al portar el balanceador TM3 (Graf *et al.*, 1989; Rodríguez-Arnaiz *et al.*, 1996).

Las alas de las moscas silvestres se separaron del cuerpo con ayuda de unas pinzas de relojero y se fijaron a un portaobjetos con solución Fauré (ver *Información técnica*, ANEXO). En cada portaobjetos se colocaron las alas de 10 hembras y 10 machos, en cuatro hileras como se indica en la Figura 6.1 (Graf *et al.*, 1984).

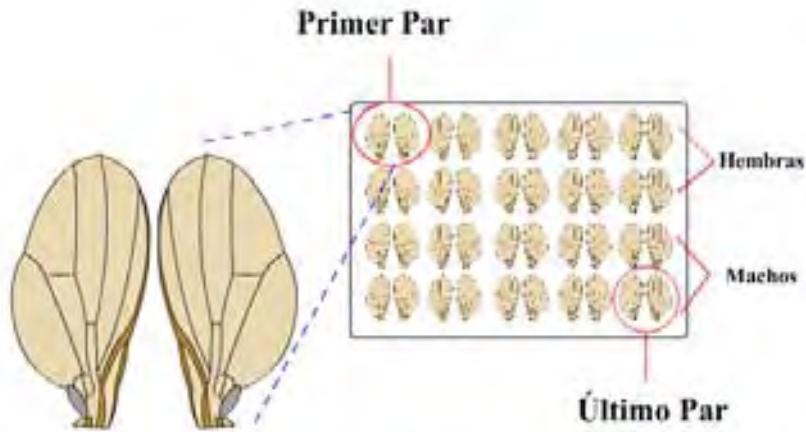


Figura 6.1. Orden de alas por preparación (Dibujo de Marco Antonio Carballo Ontiveros).

6.5.3 Análisis de las preparaciones

Las preparaciones se observaron a un aumento de 400X en un microscopio óptico y su análisis se hizo en las siete regiones distales en las que se divide el ala de *D. melanogaster* (García-Bellido y Merriam, 1971). El sentido en el que se realiza el análisis es como se muestra en la Figura 6.2.

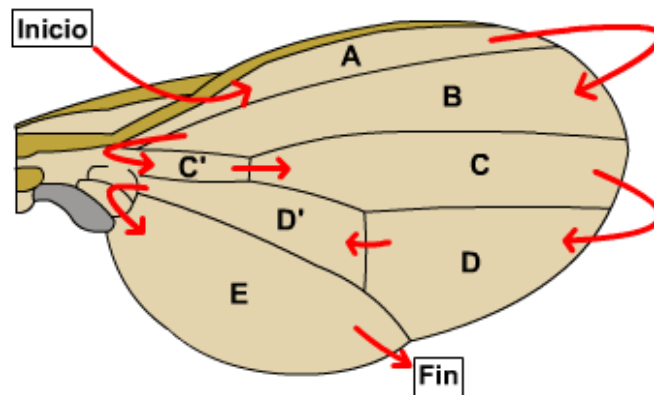
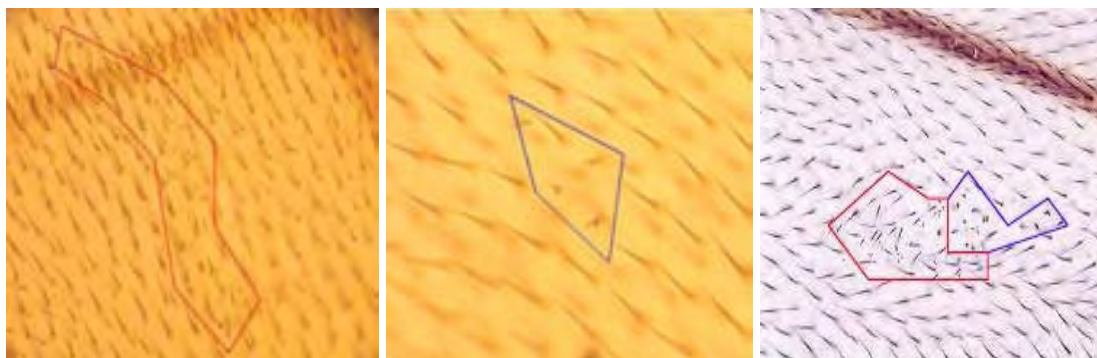


Figura 6.2. Regiones del ala de *Drosophila melanogaster*. Las flechas indican el sentido en el que se analiza un ala (Dibujo de Marco Antonio Carballo Ontiveros).

El análisis del ala consiste en la identificación de manchas por tipo. Esto se hace con ayuda de los marcadores *flr³* y *mwh*. Las manchas pueden ser: *simples*, cuando se expresa un solo marcador; o *gemelas*, cuando están presentes los dos marcadores (Fig. 6.3.). Asimismo, las manchas simples se clasifican por su

tamaño, es decir, por el número de células afectadas. Éstas pueden ser: *simples pequeñas*, cuando sólo lo presentan 1 ó 2 células afectadas; y *simples grandes*, cuando hay 3 o más células afectadas (Graf *et al.*, 1984).



(a) Mancha sencilla *mwh*

(b) Mancha sencilla *flr³*

(c) Mancha gemela

Figura 6.3. Tipos de manchas presentes en el ala de *Drosophila melanogaster*. Fotos de *manchas sencillas* de (a) *mwh* y (b) *flr³* encontradas en el ensayo SMART con *T. stans*. (c) Foto *mancha gemela* por cortesía de la Dra. América Nitxin Castañeda Sortibrán (Laboratorio de Genética de la Facultad de Ciencias, UNAM).

El registro de manchas se hace considerando la región del ala en la que éstas se presentan, además del número de células afectadas dependiendo de su tipo. Asimismo se consideran como dos manchas independientes a aquellas que se encuentran separadas por tres hileras de tricomas normales (Graf *et al.*, 1984).

6.6 Análisis estadístico.

El análisis estadístico se realizó con el programa de cómputo SMART, el cual consiste en una prueba no paramétrica de χ^2 , con un nivel de significancia del 5% (Frei y Würgler, 1988, 1995). Esto se hace con el propósito de determinar si un compuesto es o no genotóxico al comparar la frecuencia de manchas entre las series tratadas y sus respectivos controles concurrentes al plantear dos hipótesis, que son: la *Hipótesis nula* (H_0) y la *Hipótesis alternativa* (H_A).

H_0 plantea que la frecuencia de manchas en las series tratadas es igual a la de sus controles, mientras que H_A plantea lo contrario, es decir, que sí existe una diferencia en la frecuencia de manchas. Cabe señalar que la magnitud en que

cambia la frecuencia de manchas de las series con respecto a los controles se define como el factor de multiplicación “m” (Frei y Würgler, 1988).

Dependiendo de la comparación de la frecuencia de manchas se pueden alcanzar estadísticamente cuatro posibles resultados como lo muestra la Tabla 6.1.

Tabla 6.1. Resultados estadísticos al someter a prueba dos hipótesis: H_0 , Hipótesis nula; y H_A , Hipótesis alternativa (Modificado de Frei y Würgler, 1988).

Hipótesis	H_A	
	Aceptada	Rechazada
H_0		
Aceptada	Inconcluyente (i)	Negativo (-)
Rechazada	Positivo (+)	Débil positivo (d+)

Esto quiere decir que cuando H_0 es aceptada sobre H_A , se determina que el compuesto probado no es genotóxico y se concluye que el resultado es *negativo* (-); mientras que si H_A es aceptada sobre H_0 , se determina que el compuesto probado sí es genotóxico y se concluye que el resultado es *positivo* (+). No obstante, como lo exponen Frei y Würgler (1988), también existen otro dos resultados: uno donde H_0 y H_A son aceptadas, a lo que se le denomina como resultado *inconcluyente* (i) ya que no se pueden considerar al mismo tiempo dos hipótesis que son excluyentes; y, finalmente, otro donde H_0 y H_A son rechazadas, a lo que se le denomina como *débil positivo* (d+). Éste resultado indica que el compuesto es un poco genotóxico aunque la frecuencia de manchas de los tratamientos es más baja que m veces la frecuencia de los controles.

VII. RESULTADOS

7.1 Frecuencia de manchas.

Los resultados obtenidos son producto de la realización del ensayo SMART (en ala) en moscas transheterocigotas procedentes de una crucea ST. Estos individuos fueron sometidos a tratamientos con cuatro extractos de *T. stans* (hexano, acetato de etilo, metanol e infusión) en concentraciones del 0.1, 1 y 10%. Por cada tratamiento se realizó un control, correspondiente al disolvente utilizado.

La Tabla 1 muestra los resultados de la frecuencia y el tamaño promedio de las manchas de los cuatro extractos utilizados. El número total de manchas registrado indica que no hay una diferencia estadísticamente significativa en los tratamientos aplicados, puesto que los resultados son negativos. Esto indica que los extractos de *T. stans* no presentan un efecto genotóxico. No obstante, el análisis realizado para el tamaño de manchas presenta tres resultados inconcluyentes, los cuales son: 1) manchas pequeñas con el extracto de acetato de etilo al 0.1%, 2) manchas grandes con el extracto de hexano al 10%, y 3) manchas grandes con el extracto de la infusión al 0.1%.

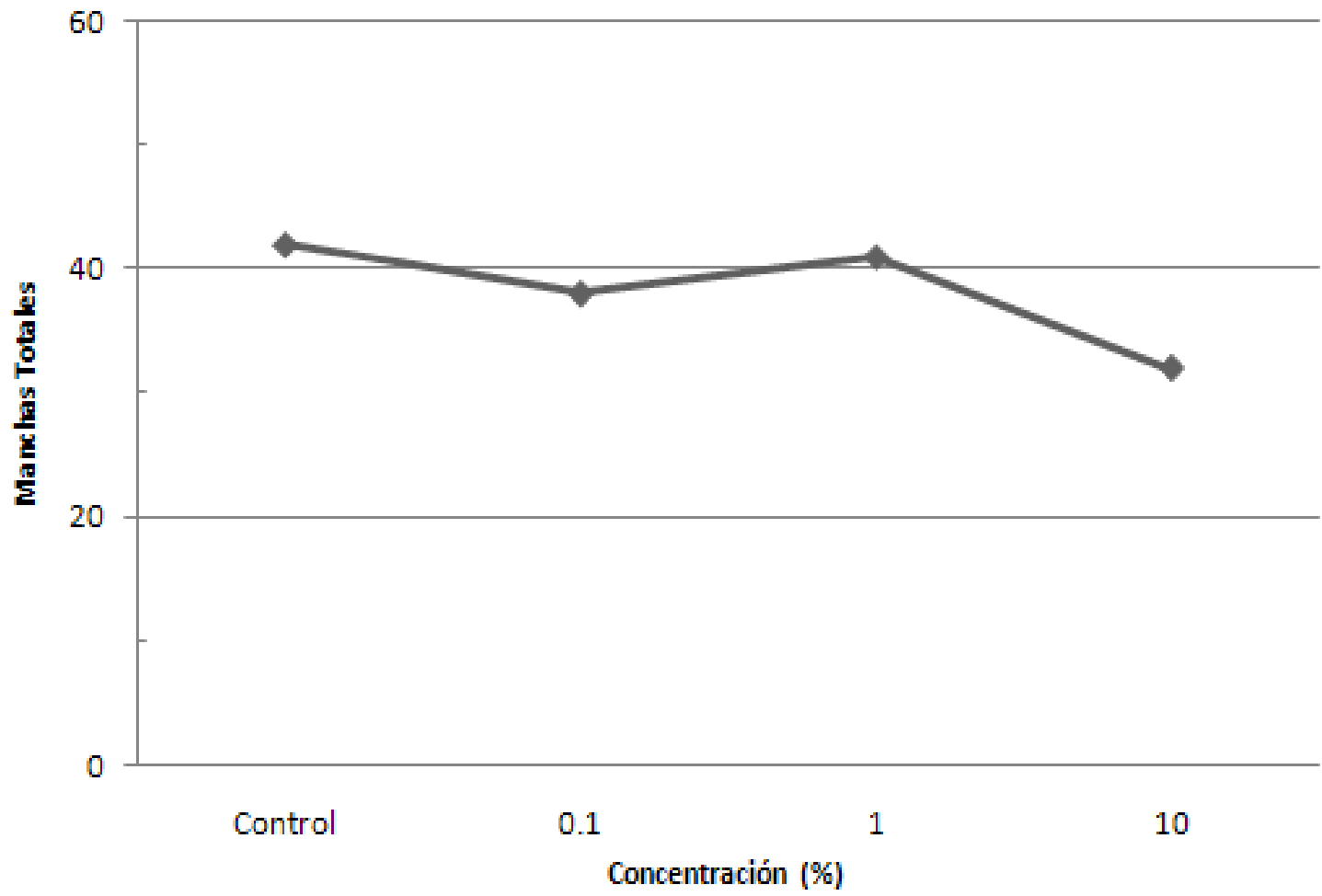
Gráficamente se aprecia que la frecuencia de manchas para el extracto de hexano (Gráfica 1) y acetato de etilo (Gráfica 2) resulta en una relación inversa, mientras que para el extracto de metanol (Gráfica 3) e infusión (Gráfica 4) la relación es asintótica.

Tabla 1. Frecuencia y número de manchas por moscas obtenidas al tratar de forma crónica larvas de $72 \pm 3h$ de edad de *Drosophila melanogaster* con diversos extractos de *Tecoma stans*.

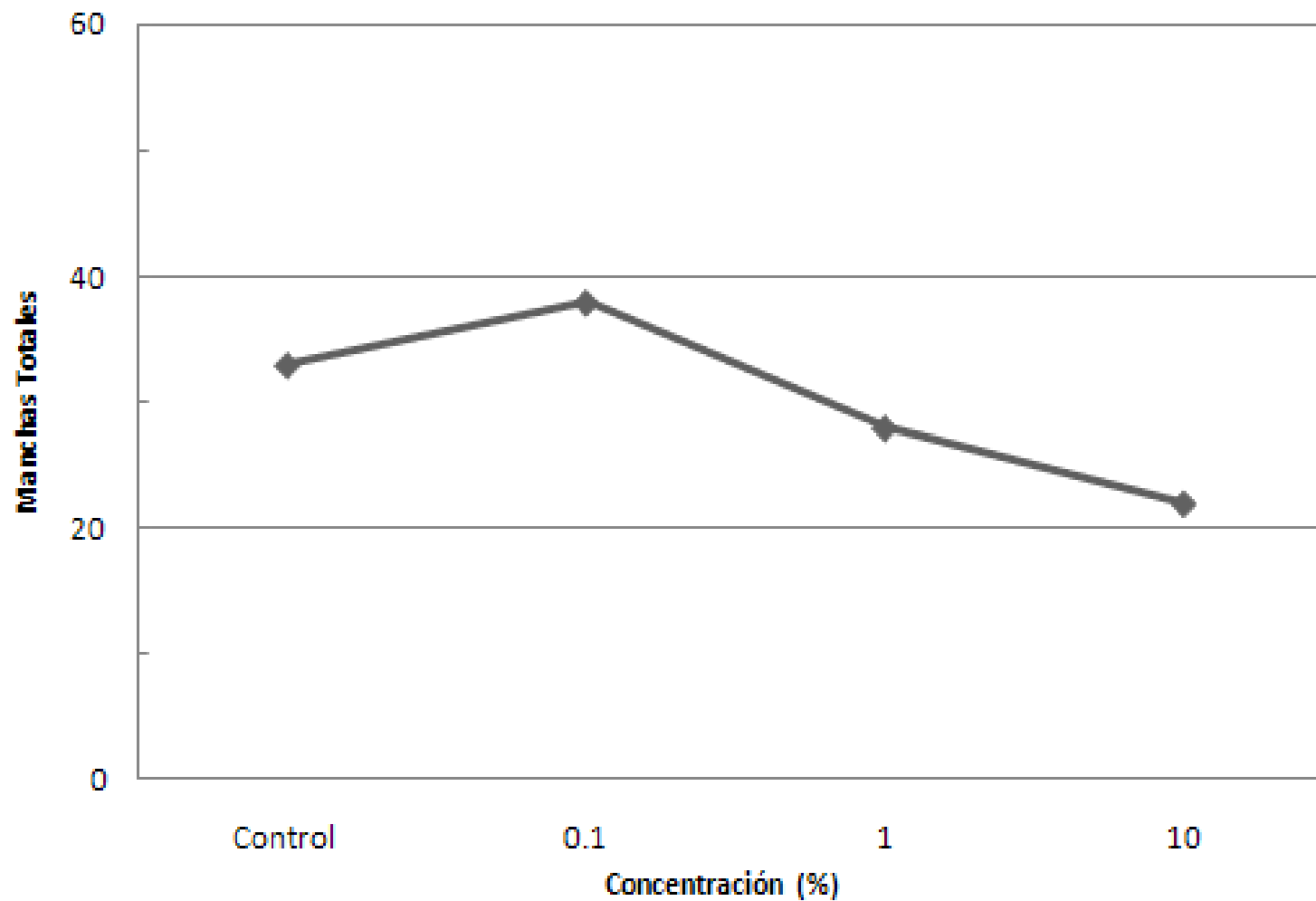
Tratamientos / Concentración (%)	Número de moscas	Frecuencia de manchas por mosca (número de manchas). Diagnóstico estadístico ^Ω				Manchas con clon <i>mwh</i>	Media por ciclos de división celular	Frecuencia de la formación de clones $\times 10^{-5}$	
		Manchas pequeñas (1-2 células) m=2.0	Manchas grandes (>2 células) m=5.0	Manchas gemelas m=5.0	Total de manchas m=2.0			Observada	Corregida
<i>Hexano</i>									
Control	60	0.67 (40)	0.03 (2)	0.00 (0)	0.7 (42)	42	1.40	1.4	
0.1	60	0.58 (35)-	0.05 (3)-	0.00 (0)	0.63 (38)-	38	1.47	1.3	-0.1
1	60	0.65 (39)-	0.03 (2)-	0.00 (0)	0.68 (41)-	41	1.39	1.4	0.0
10	60	0.4 (24)-	0.13 (8)i	0.00 (0)	0.53 (32)-	32	1.97	1.1	-0.3
<i>Acetato de etilo</i>									
Control	60	0.45 (27)	0.1 (6)	0.00 (0)	0.55 (33)	33	1.82	1.1	
0.1	59	0.59 (35)i	0.07 (4)-	0.00 (0)	0.66 (39)-	38 ^π	1.58	1.3	0.2
1	60	0.45 (27)-	0.02 (1)-	0.00 (0)	0.47 (28)-	28	1.57	1.0	-0.2
10	60	0.32 (19)-	0.05 (3)-	0.00 (0)	0.37 (22)-	22	1.59	0.8	-0.4
<i>Metanol</i>									
Control	60	0.65 (39)	0.05 (3)	0.00 (0)	0.7 (42)	42	1.43	1.4	
0.1	60	0.65 (39)-	0.07 (4)-	0.00 (0)	0.72 (43)-	43	1.56	1.5	0.0
1	60	0.37 (22)-	0.00 (0)-	0.00 (0)	0.37 (22)-	22	1.23	0.8	-0.7
10	60	0.67 (40)-	0.02 (1)-	0.00 (0)	0.68 (41)-	41	1.44	1.4	0.0
<i>Infusión</i>									
Control	60	0.65 (39)	0.05 (3)	0.00 (0)	0.7 (42)	42	1.55	1.4	
0.1	60	0.48 (29)-	0.08 (5)i	0.00 (0)	0.57 (34)-	34	1.50	1.2	-0.3
1	60	0.48 (29)-	0.05 (3)-	0.00 (0)	0.53 (32)-	32	1.75	1.1	-0.3
10	59	0.8 (47)-	0.03 (2)-	0.00 (0)	0.83 (49)-	49	1.45	1.7	0.3

^Ω Diagnóstico estadístico de acuerdo a **Frei y Würgler** (1988, 1995): (+) positivo, (-) negativo, (i) inconcluyente, (d+) débil positivo.

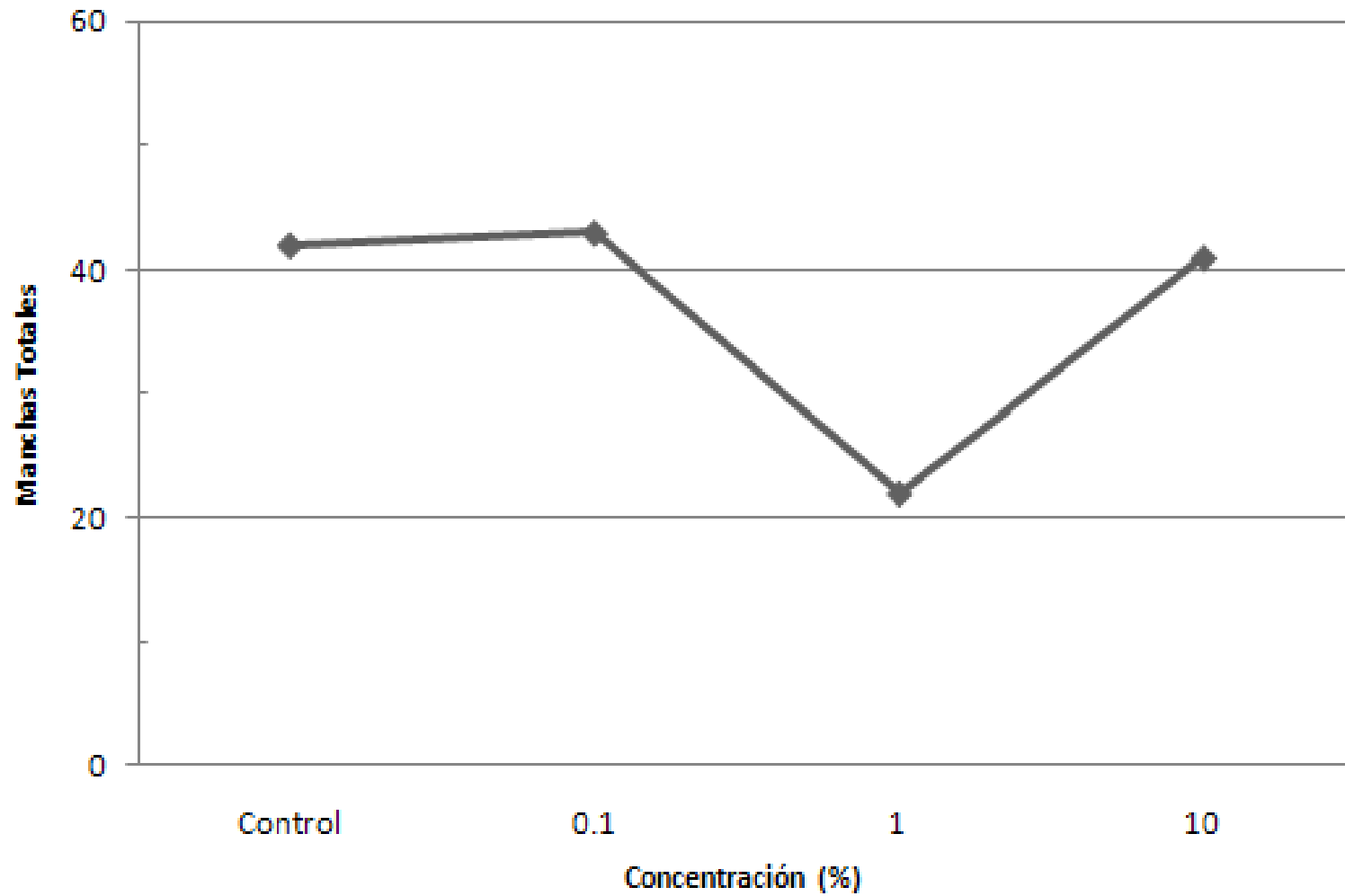
^π El total de manchas registradas para este tratamiento es de 39, pero una de ellas corresponde a una mancha sencilla *flr*³. Por lo tanto, se resta una al total.



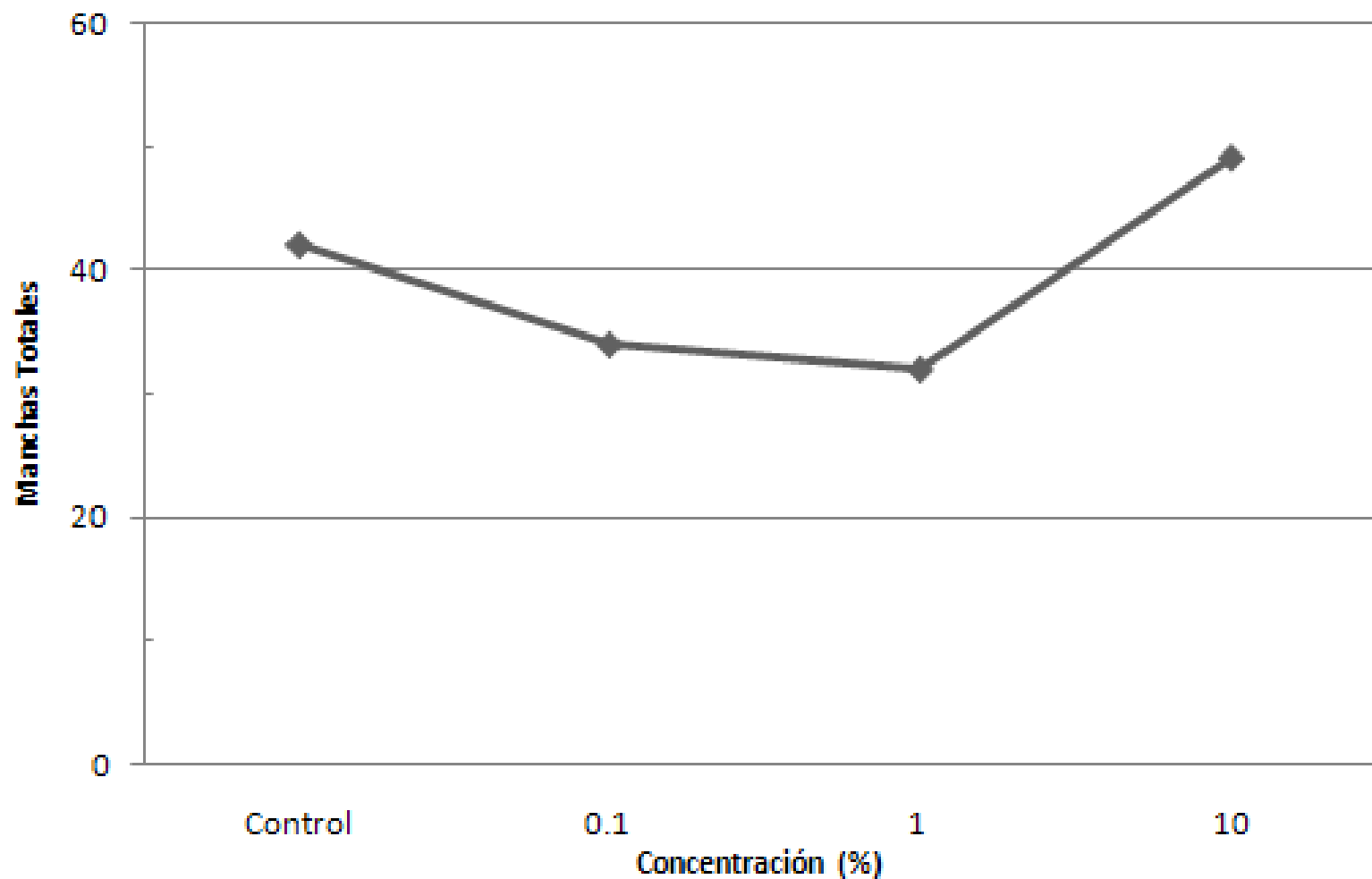
Gráfica 1. Frecuencia de manchas totales inducidas por el extracto de hexano de *Tecoma stans* en larvas de 72 ± 3 h de edad de *Drosophila melanogaster*.



Gráfica 2. Frecuencia de manchas totales inducidas por el extracto de acetato de etilo de *Tecoma stans* en larvas de $72 \pm 3h$ de edad de *Drosophila melanogaster*.



Gráfica 3. Frecuencia de manchas totales inducidas por el extracto de metanol de *Tecoma stans* en larvas de 72 ± 3 h de edad de *Drosophila melanogaster*.



Gráfica 4. Frecuencia de manchas totales inducidas por el extracto de infusión de *Tecomastans* en larvas de $72 \pm 3h$ de edad de *Drosophila melanogaster*.

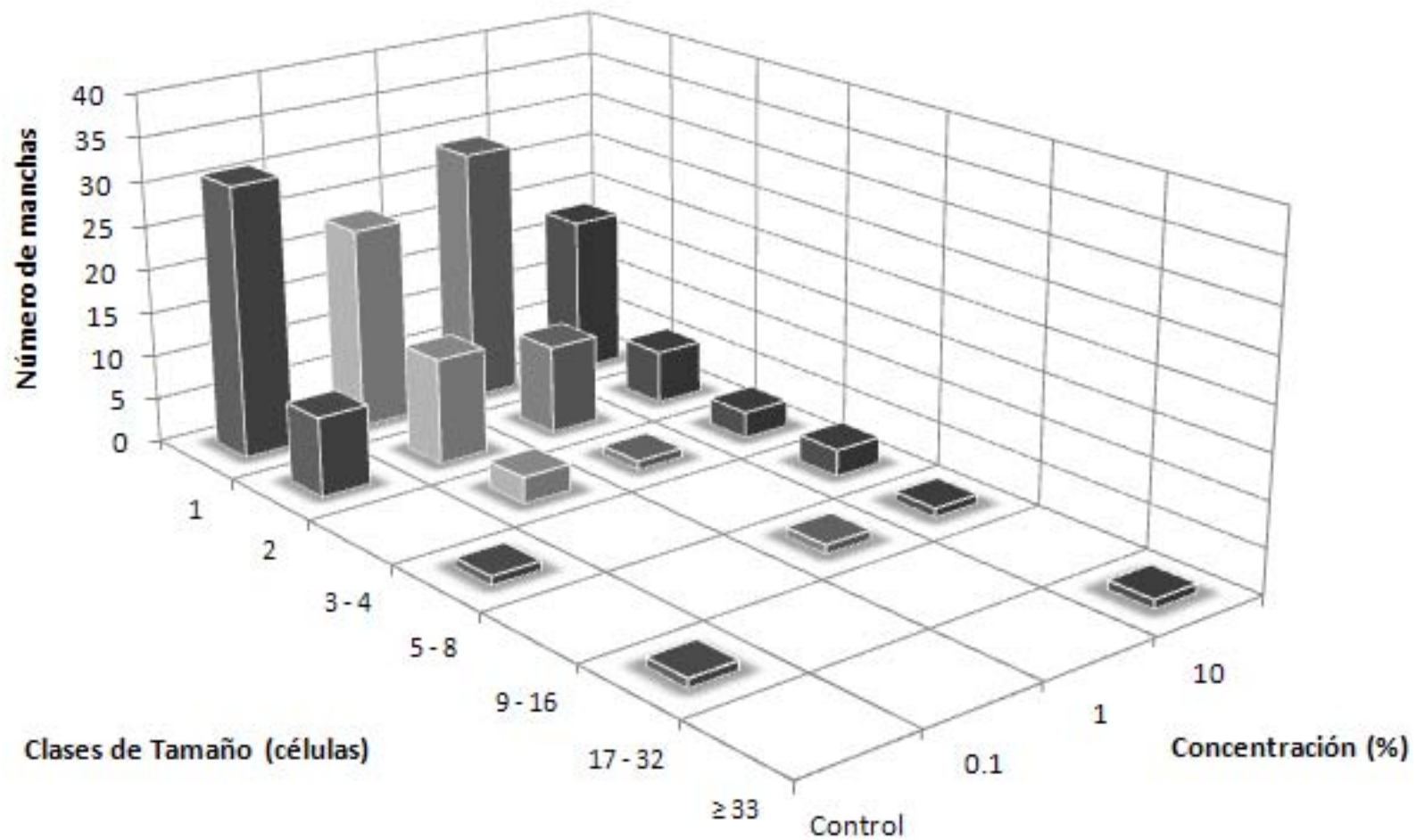
7.2 Distribución por tamaño de manchas *mwh*.

En la Tabla 2 se muestra el número de manchas *mwh* observadas por cada tratamiento dependiendo de su tamaño. En total se contemplan siete clases por tamaño, las cuales se designan del 1 al 7. Por cada clase se contempla un número de células que expresan la mutación *mwh*, se basa en el número de divisiones celulares (2^n), es decir: 1 = 1, 2 = 2, 3 = 3-4, 4 = 5-8, 5 = 9-16, 6 = 17 – 32, y 7 \geq 33 células.

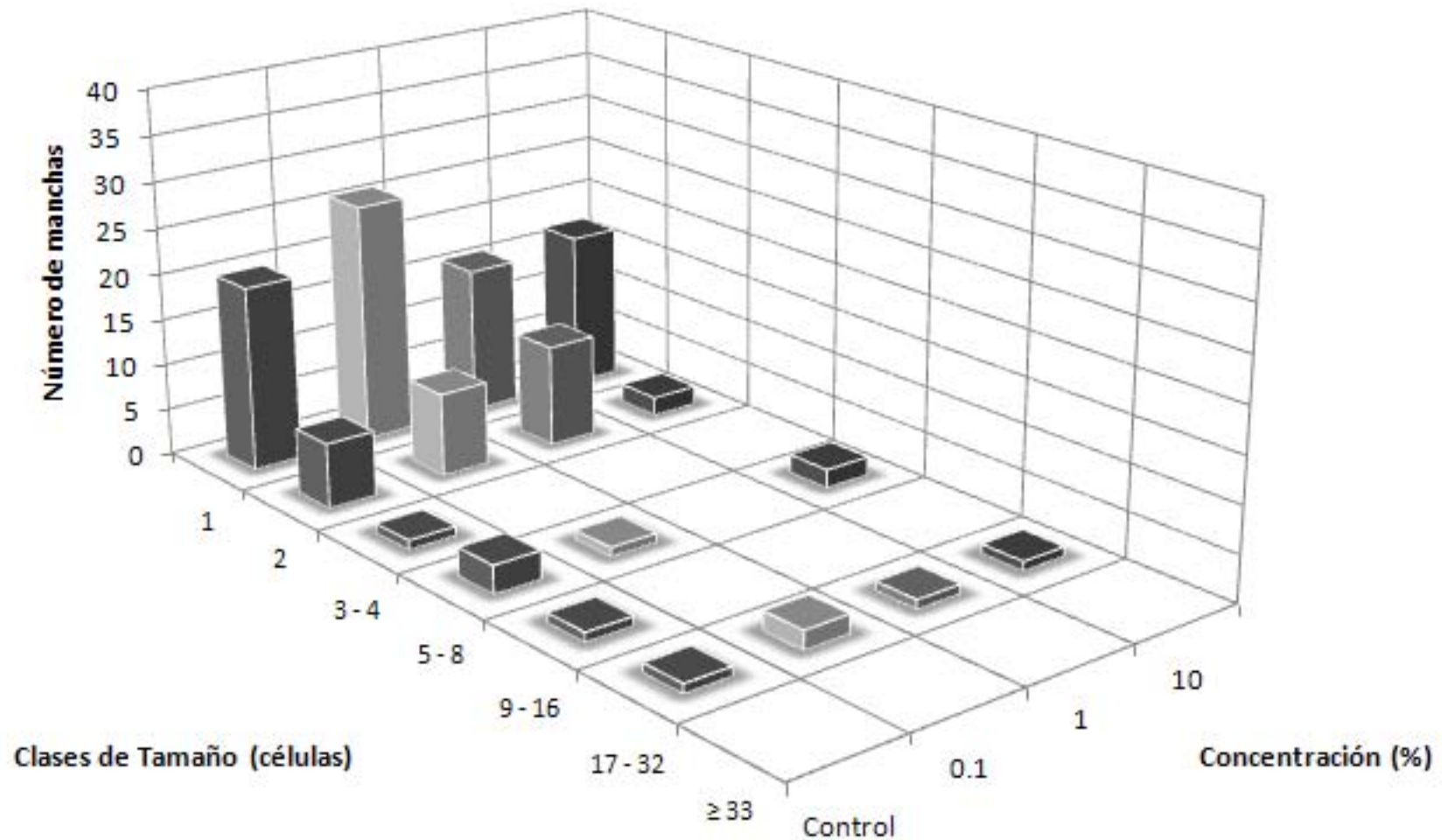
En las tres concentraciones y el control utilizados para los cuatro extractos: hexano (Gráfica 5), acetato de etilo (Gráfica 6), metanol (Gráfica 7) e infusión (Gráfica 8), se observa que la mayor presencia de manchas corresponde a una o dos células afectadas (Clases 1 y 2) y, en menor medida, a tres o más células (Clases 3 a 7). Asimismo, se aprecia que por cada extracto no existe una relación clara en: 1) el número de manchas registradas por clase y 2) los tamaños de manchas observadas, al compararse con las concentraciones y el control empleados.

Tabla 2. Distribución por tamaño de manchas sencillas *mwh*

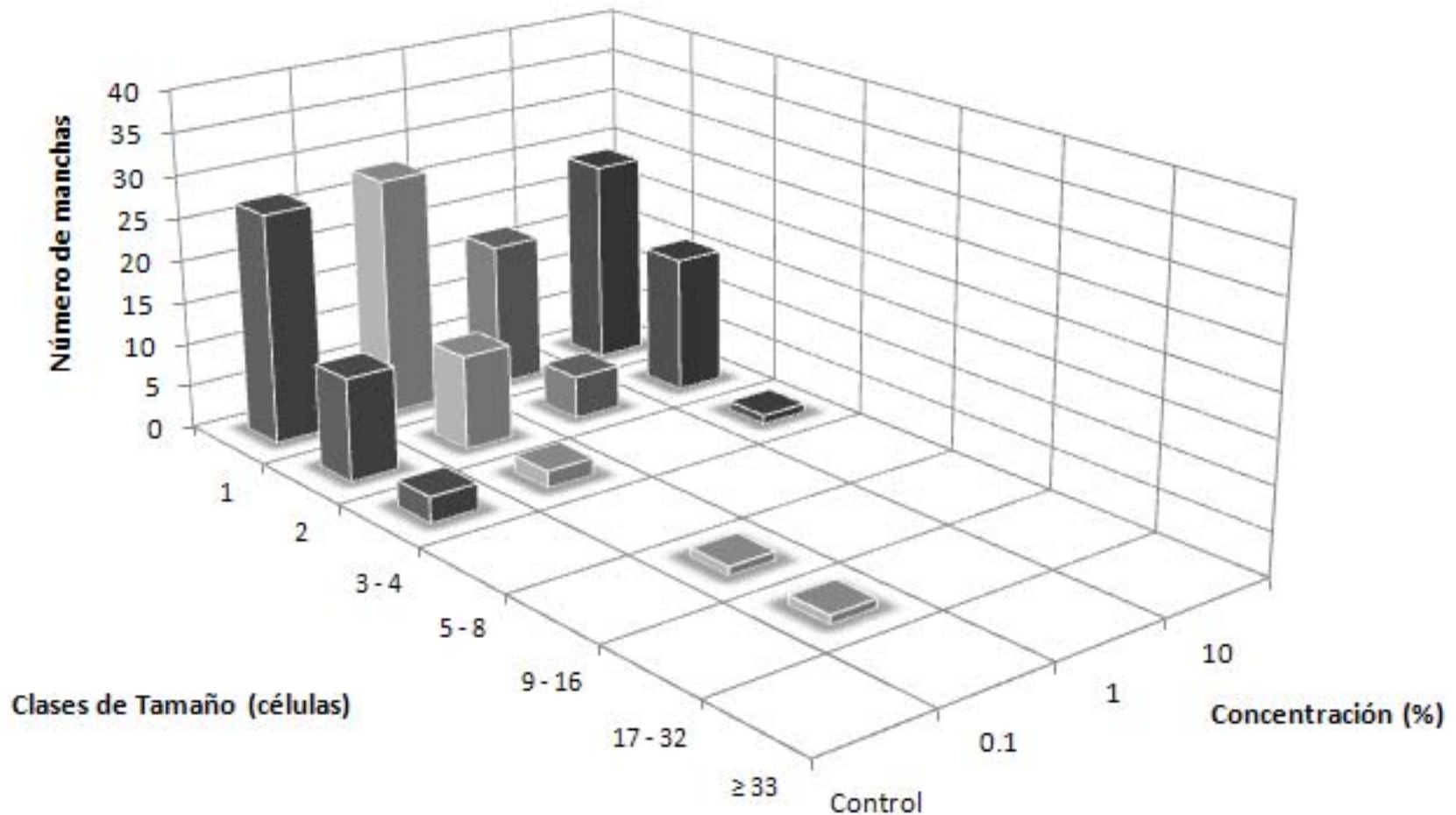
Tratamientos/ Concentración (%)	Distribución del tamaño del clon <i>mwh</i>								Total de clones <i>mwh</i>	Tamaño promedio del clon <i>mwh</i>	
	Clase de Tamaño:	1	2	3	4	5	6	7			
	Células (2 ⁿ):	1	2	3-4	5-8	9-16	17-32	>33			
<i>Hexano</i>											
Control		31	9	0	1	0	1	0		42	1.40
0.1		23	12	3	0	0	0	0		38	1.47
1		29	10	1	0	1	0	0		41	1.39
10		18	6	3	3	1	0	1		32	1.97
<i>Acetato de etilo</i>											
Control		20	7	1	3	1	1	0		33	1.82
0.1		26	9	0	1	0	2	0		38	1.58
1		16	11	0	0	0	1	0		28	1.57
10		17	2	0	2	0	1	0		22	1.59
<i>Metanol</i>											
Control		27	12	3	0	0	0	0		42	1.43
0.1		28	11	2	0	1	1	0		43	1.56
1		17	5	0	0	0	0	0		22	1.23
10		24	16	1	0	0	0	0		41	1.44
<i>Infusión</i>											
Control		30	9	0	0	1	2	0		42	1.55
0.1		25	4	4	0	0	1	0		34	1.50
1		19	10	0	0	1	2	0		32	1.75
10		36	11	0	0	0	1	1		49	1.45



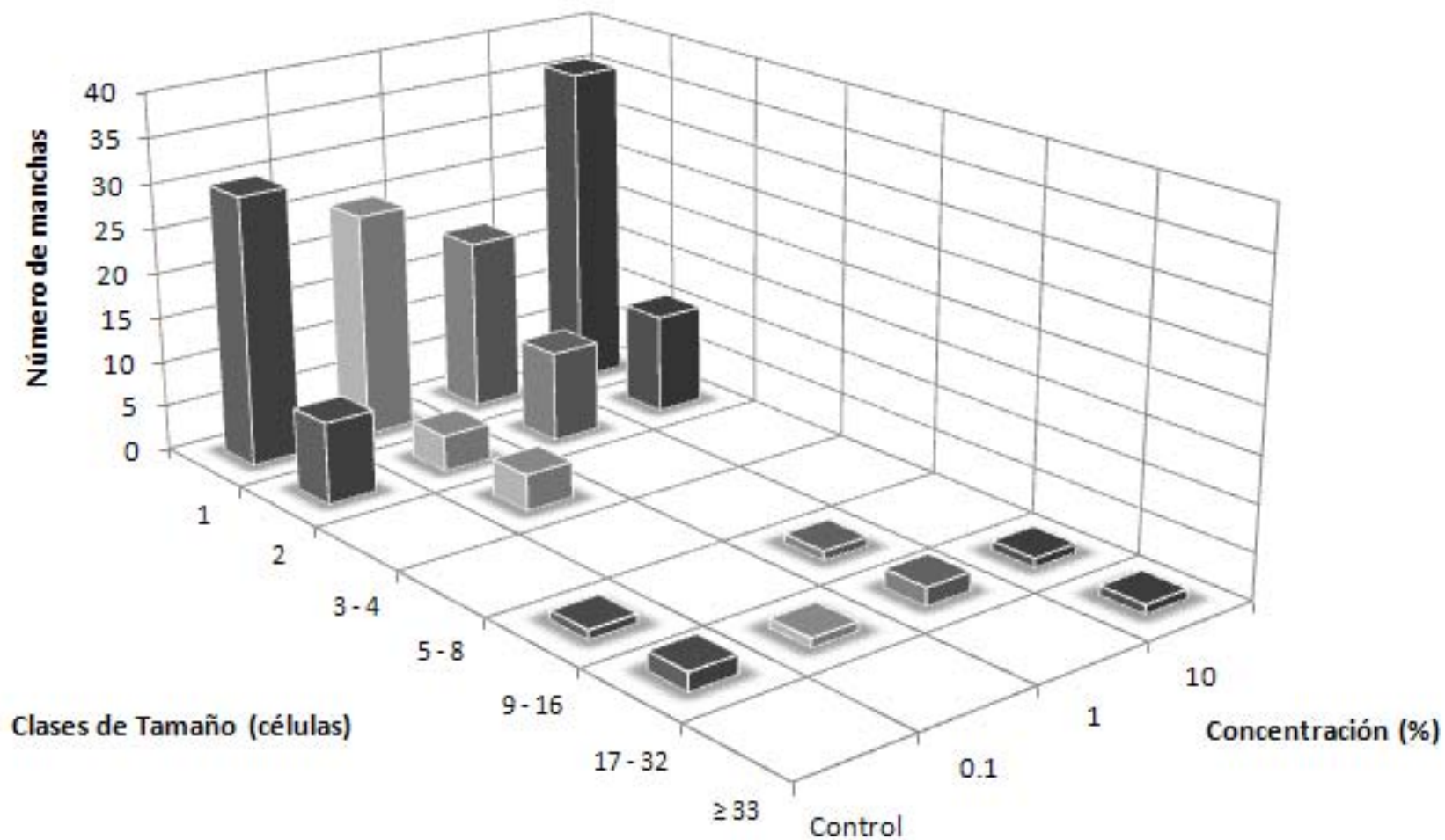
Gráfica 5. Distribución por tamaño de manchas sencillas *mwh* obtenida por el extracto de hexano de *Tecoma stans* en larvas de 72 ± 3 h de edad de *Drosophila melanogaster*.



Gráfica 6. Distribución por tamaño de manchas sencillas *mwh* obtenida por el extracto de acetato de etilo de *Tecoma stans* en larvas de $72 \pm 3h$ de edad de *Drosophila melanogaster*.



Gráfica 7. Distribución por tamaño de manchas sencillas *mwh* obtenida por el extracto de metanol de *Tecoma stans* en larvas de 72 ± 3 h de edad de *Drosophila melanogaster*.



Gráfica 8. Distribución por tamaño de manchas sencillas *mwh* obtenida por el extracto de infusión de *Tecoma stans* en larvas de 72 ± 3 h de edad de *Drosophila melanogaster*.

7.3 Manchas flr³ y gemelas.

Dentro del ensayo SMART realizado sólo se registró la presencia de una mancha sencilla *flr*³, la cual corresponde al tratamiento de acetato de etilo al 0.1%. Esta mancha presentó 4 células afectadas, por lo que entra dentro de la clase de tamaño 3.

Por otro lado, no se tuvo registro alguno de manchas gemelas en el ensayo.

VIII. DISCUSIÓN

El uso de las plantas medicinales forma parte del conocimiento tradicional de varias culturas en México (Heinrich *et al.*, 1998), por lo que el estudio y confirmación del efecto que se les atribuye a dichas plantas en el tratamiento de enfermedades particulares ha sido el aspecto central de la etnofarmacología. Uno de los objetivos de esta disciplina es el llegar a la producción de fitomedicamentos que sean aprobados por las autoridades en salud (Andrade-Cetto *et al.*, 2006). En este contexto, un ejemplo claro sobre el alcance que tiene el estudio de dichas plantas es el de *Galega officinalis* (también conocida como lila francesa). El uso de esta planta data desde los tiempos medievales y era recetada para aliviar a las personas que padecían de una producción excesiva de orina (signo que se relacionó después con la D.M.) (Witters, 2001). Sin embargo, no fue hasta el estudio químico de *G. officinalis*, en el siglo XX, cuando se identificó a la guanidina como el compuesto responsable del efecto que se producía sobre los pacientes con D.M, al igual que se constató el riesgo de toxicidad por su uso. Estos estudios sirvieron de base para identificar otra forma de la guanidina, la biguanida, que probó ser igual de efectiva sobre pacientes diabéticos, pero menos tóxica. Dicho compuesto sirve, hoy en día, para la producción del medicamento conocido como metformina, comúnmente usado en el tratamiento de la D.M. (Witters, 2001; Andrade-Cetto y Heinrich, 2005).

En México se reporta el uso tradicional de 306 especies de plantas para combatir la D.M (Andrade-Cetto y Heinrich, 2005), de las cuales sólo algunas han sido utilizadas en experimentos para constatar el efecto que tienen sobre dicho mal y, en menor número, si sus extractos presentan un efecto genotóxico. Tres ejemplos de plantas estudiadas en estos aspectos son: *Equisetum myriochaetum* (Revilla-Monsalve *et al.*, 2002; Ordaz-Téllez *et al.*, 2007), *Cecropia obtusifolia* (Andrade-Cetto y Wiedenfeld, 2001; Revilla-Monsalve *et al.*, 2007; Martínez-Toledo *et al.*, 2008), y *Malmea depressa* (Ruiz-Esparza, 2006; Andrade-Cetto *et al.*, 2008).

En la actualidad, *Tecoma stans* es una de las especies de plantas utilizadas en la medicina tradicional (Andrade-Cetto y Heinrich, 2005) con la que se han realizado estudios para constatar el efecto hipoglucémico que se le atribuye (Loyoza-Meckes y Mellado-Campos, 1985; Román-Ramos *et al.*, 1991; Costantino *et al.*, 2003 a, b; Aguilar-Santamaría *et al.*, 2009), así como para conocer e identificar sus componentes activos (Dickinson y Jones, 1969; Costantino *et al.*, 2003 a, b). Los resultados de estos estudios indican que *T. stans* presenta un efecto hipoglucémico sólo cuando se emplea su extracto acuoso (Loyoza-Meckes y Mellado-Campos, 1985; Aguilar-Santamaría *et al.*, 2009), ya que no se ha obtenido el mismo resultado cuando se han probado sus compuestos individualmente (Costantino *et al.*, 2003 a, b); por lo que los compuestos responsables y el modo de acción del efecto hipoglucémico de *T. stans* continúan siendo un tema controversial que requiere de estudios adicionales (Aguilar-Santamaría *et al.*, 2009).

Con respecto a la toxicidad y, en particular, a la genotoxicidad de *T. stans*, cabe mencionar que no existen reportes o estudios previos en modelos *in vivo*, a pesar de que se conocen los compuestos químicos de esta planta. *T. stans* está constituida por: glucósidos, alcaloides, fenoles, flavonoides y terpenos (Mendoza-Amador, en preparación); entre los cuales destacan los alcaloides, considerados las toxinas vegetales más potentes desde el punto de vista genotóxico (Rodríguez-Arnaiz, 2003 a). Sin embargo, es importante resaltar el hecho de que la composición de alcaloides en *T. stans* puede variar de acuerdo al lugar donde crece (Dickinson y Jones, 1969), como también su concentración en los extractos dependiendo del disolvente empleado (Mendoza-Amador, en preparación).

Para la evaluación de compuestos químicos de los que se sospecha un efecto genotóxico, el ensayo SMART resulta ser un procedimiento corto y económico a través del cual se puede hacer un análisis confiable usando a *Drosophila melanogaster* como modelo biológico (Graf *et al.*, 1984). La evaluación realizada de cuatro extractos de *T. stans* (hexano, acetato de etilo, metanol e infusión) por

medio de este ensayo revela la ausencia de un efecto genotóxico en concentraciones del 0.1, 1 y 10%.

En comparación a otros ensayos SMART realizados con extractos acuosos de plantas como *Equisetum myriochaetum* (Ordaz-Téllez *et al.*, 2007), *Cecropia obtusifolia* (Martínez-Toledo *et al.*, 2008), y *Malmea depressa* (Ruiz-Esparza, 2006) en tratamientos agudos con la craza ST, *T. stans* presenta una respuesta similar a pesar de haber sido aplicada con un tratamiento crónico. Este resultado implica la presencia de manchas pequeñas en su mayoría, a comparación de las manchas grandes. No obstante, los resultado en *T. stans* difieren de los de *E. myriochaetum* y *C. obtusifolia* en que no se observó la presencia de manchas gemelas, lo cual sugiere que la recombinación mitótica no es el principal evento genético producido por los extractos de *T. stans*; así como también difiere al no presentar diferencias estadísticamente significativas entre las series tratadas y controles. En estos aspectos *T. stans* y *M. depressa* resultan ser parecidas.

Cabe señalar que para mejorar la detección de compuestos genotóxicos mediante el ensayo SMART / ala es posible hacer uso de dos sistemas de craza con la mosca. El primero de ellos corresponde a la craza ST, en la cual sólo se portan los marcadores *flr*³ y *mwh* (para hembras y machos, respectivamente); mientras que el segundo emplea la mutación *ORR* (Oregon resistente), que otorga resistencia al DDT e insecticidas organofosforados al sobreexpresar de forma constitutiva el sistema de citocromos P450, en particular la enzima CYP6A2 que es equiparable en función a la CYP3a-16 en ratón y a la CYP3A en el ser humano (Graf y van Schaik, 1992, Saner *et al.*, 1996; Itoh *et al.*, 1994). La mutación *ORR* se emplea junto al marcador *flr*³ en las hembras para realizar la craza con machos que portan la mutación *mwh*. Esta craza es conocida como HB (High Bioactivation, por sus siglas en inglés) (Graf y van Schaik, 1992). En este aspecto, cuando se analiza un compuesto genotóxico, la frecuencia de manchas resultante es más evidente en la craza HB cuando se compara con la craza ST. Los estudios realizados con *E. myriochaetum* (Ordaz-Téllez *et al.*, 2007), *C. obtusifolia* (Martínez-Toledo *et al.*, 2008) y *M. depressa* (Ruiz-Esparza, 2006) mediante el uso

de la cruza ST y HB en el ensayo SMART muestran una leve variación en la frecuencia de manchas ya que ninguno de los extractos empleados resultó ser genotóxico. Bajo este contexto y a la carencia de evidencia sobre la genotoxicidad de *T. stans*, el estudio presente fue realizado sólo con la cruza ST.

Por otra parte, el tamaño observado de las manchas producidas por los extractos de *T. stans* sirve como evidencia para saber si sus compuestos químicos requieren ser metabolizados, ya que de no ser necesario dicho metabolismo los compuestos pasarían directamente al material genético de las moscas ocasionando alteraciones que se manifestarían en un mayor número de células afectadas (manchas grandes). Sin embargo, los resultados obtenidos señalan un mayor número de manchas pequeñas, lo que deja en claro la necesidad del metabolismo para activar los compuestos presentes en los extractos utilizados.

Con respecto a la frecuencia de manchas generadas por el uso de los extractos de *T. stans*, se observó que no existe una correlación clara con las concentraciones utilizadas, aunque hay excepciones como el caso de los extractos de acetato de etilo y hexano. Este resultado se atribuye a la presencia de flavonoides, ya que existen reportes donde se constatan sus efectos benéficos como antioxidantes al reducir el daño oxidativo inducido al DNA *in vitro* (Noroozi *et al.*, 1998), y a que son de los compuestos que tienen mayor presencia en los extractos de *T. stans* (principalmente en los que emplean al acetato de etilo como disolvente) de acuerdo a Mendoza-Amador (en preparación). En este sentido, la relación inversa que se observa en las Gráficas 1 y 2 se explica por la disminución en la presencia de alcaloides con respecto a los flavonoides, así como por el efecto de protección que confieren al DNA estos últimos. Sin embargo, es necesario realizar más estudios que permitan identificar las propiedades exactas de los flavonoides que porta esta planta.

Esto convierte al presente estudio en una de las primeras referencias que se tienen sobre la genotoxicidad de *T. stans* en ensayos *in vivo*, ya que, hasta la fecha, el único estudio que hace mención sobre uno de los aspectos toxicológicos de esta planta corresponde a Zhu *et al.* (2008) con el ensayo *in vitro* de células

hepáticas cancerígenas humanas (HepG2) en el que se determinó el efecto citotóxico de *T. stans*.

IX. CONCLUSIONES

- Los extractos utilizados de *T. stans* (hexano, acetato de etilo, metanol e infusión) no presentaron efecto genotóxico alguno en el ensayo de SMART / ala de *Drosophila melanogaster*, utilizando concentraciones del 0.1, 1 y 10%.
- Este trabajo sirve de referencia para futuros estudios sobre *T. stans* en cuanto a la ausencia de genotoxicidad en el uso de sus extractos.

LITERATURA CITADA

Aguilar-Santamaría L., Ramírez G., Nicasio P., Alegría-Reyes C., Herrera-Arellano A. (2009). **Antidiabetic activities of *Tecoma stans* (L.) Juss. ex Kunth.** *Journal of Ethnopharmacology*. 124: 284-288.

Andrade-Cetto A., Wiedenfeld H. (2001). **Hypoglycemic effect of *Cecropia obtusifolia* on streptozotocin diabetic rats.** *Journal of Ethnopharmacology*. 78: 145-149.

_____, Heinrich M. (2005). **Mexican plants with hypoglycaemic effect used in the treatment of diabetes.** *Journal of Ethnopharmacology*. 99: 325-348.

_____, Becerra-Jiménez J., Martínez-Zurita E., Ortega-Larrocea P., Heinrich M. (2006). **Disease-Consensus Index as a tool of selecting potential hypoglycemic plants in Chikindzonot, Yucatán, México.** *Journal of Ethnopharmacology*. 107: 199-204.

_____, Martínez-Zurita E., Soto-Constantino A., Revilla-Monsalve M.C., Wiedenfeld H. (2008). **Chronic hypoglycemic effect of *Malmea depressa* root on n5-streptozotocin diabetic rats.** *Journal of Ethnopharmacology*. 116: 358-362.

Ashburner M. (1989). ***Drosophila: A Laboratory Handbook*.** Cold Spring Harbor Laboratory Press. E.U.A. pp. 140.

Barahona A., Piñero D. (2002). **GENÉTICA: La continuidad de la vida.** Tercera edición. La ciencia para todos. Fondo de Cultura Económica. México. pp. 144.

Brusick D. (1987). **Principles of Genetic Toxicology.** Segunda edición. Plenum Press. E.U.A. pp 1-2, 33-36, 53-54.

Casciano D.A. (1991). **Introduction: Historical Perspectives of Genetic Toxicology.** En: Li A.P., Helfich R.H (eds.). *Genetic Toxicology*. CRC Press. E.U.A. pp. 1-2.

Coon M.J., Vaz A.D., Bestervelt L.L.(1996). **Cytochrome P450 2: peroxidative reactions of diversozymes.** *FASEB journal*. 10: 428-434.

Costantino L., Lins A.P., Barlocco D., Celotti F., El-Abady S.A., Brunetti T., Maggi R., Antolini L. (2003 a). **Characterization and pharmacological actions of tecostanine, and alkaloid of *Tecoma stans***. *Pharmazie*. 58: 140-142.

_____, Raimondi L., Pirisino R., Brunetti T., Pessotto P., Giannesi F., Lins A.P., Barlocco D., Antolini L., El-Abady S.A. (2003 b). **Isolation and pharmacological activities of the *Tecoma stans* alkaloids**. *Il Farmaco*. 58: 781-785.

Demerec M., Kaufmann B.P. (1962). **Introducción a la Genética y Citología de *Drosophila melanogaster***. Comisión Nacional de Energía Nuclear (Programa de Genética). México. pp. 4-10, 12.

Dickinson E.M., Jones G. (1969). **Pyridane alkaloids from *Tecoma stans***. *Tetrahedron*. 25: 1523-1529.

Dunkov B.C., Rodríguez-Arnaiz R., Pittendrigh B., Ffrench-Constant R.H., Feyereisen R. (1996). **Cytochrome P450 gene clusters in *Drosophila melanogaster***. *Molecular & General Genetics*. 251: 290-297.

Ebadi M. (2006). **Pharmacodynamics Basis of Herbal Medicine**. Segunda Edición. CRC Press. E.U.A.. pp. 1.

Frei H., 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: 297-308.

_____. (1995). **Optimal experimental design and sample size for the statistical evaluation of data from somatic mutation and recombination tests (SMART) in *Drosophila***. *Mutation Research*. 334: 247-258.

García-Bellido A., Merriam J.R. (1971). **Parameters of the Wing Imaginal Disc Development of *Drosophila melanogaster***. *Developmental Biology*. 24: 61-87.

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

_____, Frei H., Kägi A., Katz A.J., Würgler F.E. (1989). **Thirty compounds tested in *Drosophila* wing spot test**. *Mutation Research*. 222: 359-373.

_____, van Schaik N. (1992). **Improved high bioactivation cross for the wing somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster***. *Mutation Research*. 271: 59-67.

Heinrich M., Ankli A., Frei B., Weimann C., Sticher O. (1998). **Medicinal plants in Mexico: Healers' consensus and cultural importance.** *Social science & medicine.* 47: 1859-1871.

Islas-Andrade S., Revilla-Monsalve M.C. (2004). **Diabetes Mellitus.** Tercera Edición. Ed. Mc Graw-Hill. México. pp. 3-20.

Itoh S., Satoh M., Abe Y., Hashimoto H., Yanagimoto T., Kamataki T.(1994). **A novel form of mouse cytochrome P450 3A (Cyp3a-16). Its cDNA cloning and expression in fetal liver.** *European journal of biochemistry / FEBS.* 226: 877-882.

Kamrin M.A. (1990). **Toxicology: A primer on toxicology principles and applications.** Cuarta edición. Lewis Publishers. E.U.A. pp. 138.

Kunth K.S. (1819). **Nova Genera et Species Plantarum.** Lutetiae Parisiorum. Francia. Volumen 3. pp. 144.

Levine R.P. (1974). **Genética.** Segunda Edición. C.E.C.S.A. México. pp. 173.

Lindsley D.L., Zimm G.G. (1992). **The genome of *Drosophila melanogaster*.** Academic Press. E.U.A. pp vii, 180, 218, 483, 1075.

Loyoza-Meckes M., Mellado-Campos V. (1985). **Is the *Tecoma stans* infusion an antidiabetic remedy?** *Journal of Ethnopharmacology.* 14: 1-9.

Manahan S.E. (2003). **Toxicological chemistry and biochemistry.** Tercera edición. Lewis Publishers (CRC Press). E.U.A. pp. 115, 322-323.

Martínez-Toledo V., Ordaz-Téllez M.G., Castañeda-Sortibrán A.N., Andrade-Cetto A., Rodríguez-Arnaiz 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.** *Journal of Ethnopharmacology.* 116: 58-63.

Meigen J.W. (1830). **Systematische Beschreibung der bekannten europäischen zweiflügeligen Insekten.** *Schulz-Wundermann.* Volumen 6. pp. 85.

Mendoza-Amador A.A. (en preparación). **Estudio genotóxico de la tintura de *Tecoma stans* en linfocitos humanos *in vitro*.** Tesis de Licenciatura (Biología). Facultad de Ciencias, UNAM.

Noroozi M., Angerson W.J., Lean M.E. (1998). **Effects of flavonoids and vitamin C on oxidative DNA damage to human lymphocytes.** *The American Journal of Clinical Nutrition.* 67: 1210-1218.

Ordaz-Téllez M.G., Bárcenas-Rodríguez H., Quevedo-Olivares G., Castañeda-Sortibrán A.N., Andrade-Cetto A., Rodríguez-Arnaiz R. (2007). **A phytotherapeutic extract of *Equisetum myriochaetum* is not genotoxic either in the *in vivo* wing somatic test of *Drosophila* or in the *in vitro* human micronucleus test.** *Journal of Ethnopharmacology*. 111: 182-189.

Revilla-Monsalve M.C., Andrade-Cetto A., Islas-Andrade S., Wiedenfeld H. (2002). **Hypoglycemic effect of *Equisetum myriochaetum* aerial parts on type 2 diabetic patients.** *Journal of Ethnopharmacology*. 81: 117-120.

_____, Andrade-Cetto A., Palomino-Garibay M.A., Wiedenfeld H., Islas-Andrade S. (2007). **Hypoglycemic effect of *Cecropia obtusifolia* Bertol aqueous extracts on type 2 diabetic patients.** *Journal of Ethnopharmacology*. 111: 636-640.

Rodríguez-Arnaiz R., Orozco-Soto P., Gaytán-Oyarzún J.C., Graf U. (1996). **Analysis of mitotic recombination induced by several mono- and bifunctional alkylating agents in the *Drosophila* wing-spot test.** *Mutation Research*. 351: 133-145.

_____. (2003 a). **Las toxinas ambientales y sus efectos genéticos.** Cuarta edición. La ciencia para todos. Fondo de Cultura Económica. México. pp. 11, 19-22, 39-46, 63.

_____. (2003 b). ***Drosophila* COMO ORGANISMO MODELO EN LA BIOLOGÍA EXPERIMENTAL.** En: Jiménez L.F., Merchant H (eds.). *Biología Celular y Molecular*. Editorial Prentice Hall. México. pp. 761-791.

_____. (2004). **Metabolismo de las toxinas ambientales.** La ciencia para todos. Fondo de Cultura Económica. México. pp. 26-35.

_____, Becerra A., Castañeda-Partida L., Castañeda-Sortibrán A.N., Delaye L.J., Ordaz-Téllez M.G., Valadéz-Graham V., Vázquez-Cuevas M.J. (2005). **Manual de Prácticas de Genética y Cuaderno de Trabajo.** Las prensas de Ciencias (U.N.A.M.). México. pp. 13-15, 292.

Román-Ramos R., Flores-Saenz J.L., Partida-Hernández G., Lara-Lemus A., Alarcón-Aguilar F. (1991). **Experimental study of the hypoglycemic effect of some antidiabetic plants.** *Archivos de Investigación Médica*. 22: 87-93.

Ruiz-Esparza R. (2006). **Determinación del efecto genotóxico de *Malmea depressa* mediante el empleo de células somáticas del ala de *Drosophila melanogaster*.** Tesis de Licenciatura (Biología). Facultad de Ciencias, UNAM. 55p.

Russel P.J. (1992). **Genetics**. Tercera edición. HarperCollins Publishers. E.U.A. pp. 545-546.

Saner C., Weibel B., Würigler F.E., Sengstag C. (1996). **Metabolism of Promutagens Catalyzed by *Drosophila melanogaster* CYP6A2 Enzyme in *Saccharomyces cerevisiae***. *Environmental and Molecular Mutagenesis*. 27: 46-58.

Shearn A., Garen A. (1974). **Genetic control of imaginal disc development in *Drosophila***. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 71: 1393-1397.

Tamarin R.H. (2004). **Principios de Genética**. Editorial Reverté. México. pp. 460, G-12.

Tijet N., Helvig C., Feyereisen R. (2001). **The cytochrome P450 gene superfamily in *Drosophila melanogaster*: Annotation, intro-exon organization and phylogeny**. *GENE*. 262: 189-198.

Vega S. (1985). **Toxicología II: Toxicocinética**. *Curso de evaluación epidemiológica de riesgos causados por agentes químicos ambientales*. Centro Panamericano de Ecología Humana y Salud, Organización Panamericana de la Salud, Organización Mundial de la Salud. Tomo 4. pp. 1-4, 28-29, 33.

Wild D., Rogelic G., Green A., Sicree R., King H. (2004). **Global Prevalence of Diabetes: Estimates for the year 2000 and projections for 2030**. *Diabetes Care*. 27: 1047-1053.

Witters L.A. (2001). **The blooming of the French lilac**. *The Journal of Clinical Investigation*. 108: 1105-1107.

Zhu J., Viñas R., Smith E.E. (2008). ***In vitro* evaluation of human liver cancer cells and the potential cytotoxicity of *Tecoma stans* (Bignoniaceae) and *Brickellia cavanillesi* (Asteraceae) both single and in combination**. *Toxicological & Environmental Chemistry*. 90: 801-808.

SITIOS ELECTRÓNICOS

Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO), *Tecoma stans* (consultado julio 2009). Disponible en la página:

http://www.conabio.gob.mx/conocimiento/info_especies/arboles/doctos/12-bigno8m.PDF

Desert-Tropicals, *Tecoma stans* (consultado Julio 2009). Disponible en la página:

http://www.desert-tropicals.com/Plants/Bignoniaceae/Tecoma_stans3.jpg

Division of Structural Biology / Life Science Research Center (Kagawa University), *Citocromo P450* (consultado Agosto 2009). Disponible en la página:

<http://www.kms.ac.jp/~xraylab/research/image15.jpg>

Instituto Nacional de Salud Pública (INSP), *¿Qué es la diabetes mellitus?* (consultado julio 2009). Disponible en la página:

http://www.insp.mx/Portal/Cuidados_salud/tema15.html

ITM Online, *Ácido clorogénico* (consultado julio 2009). Disponible en la página:

<http://www.itmonline.org/image/chlorogenic2.jpg>

Lady Bird Johnson Wildflower center (the University of Texas at Austin), *Tecoma stans* (consultado julio 2009). Disponible en la página:

http://www.wildflower.org/image_archive/640x480/PCD1323/PCD1323_IMG0099.JPG

National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases (NIDDK), *Diabetes Overview* (consultado julio 2009). Disponible en la página:

<http://diabetes.niddk.nih.gov/dm/pubs/overview/index.htm>

Organización Mundial de la Salud (OMS), *Diabetes* (consultado julio 2009 a). Disponible en la página:

<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs312/es/index.html>

_____, *Estadísticas Sanitarias Mundiales 2008* (consultado julio 2009 b). Disponible en la página:

http://www.who.int/whosis/whostat/EN_WHS08_Part1.pdf

Sistema Nacional de Información de Salud (SINAIS), *Diez principales causas de mortalidad en hombres y mujeres (por grupos de edad)* (consultado julio 2009).
Disponible en la página:

http://sinais.salud.gob.mx/descargas/xls/diezprincausasmort2007_CNEGySR.xls

Wildflowers of Tucson, Arizona; *Yellow Trumpetbrush* (consultado Julio 2009).
Disponible en la página:

<http://www.fireflyforest.com/flowers/yellows/yellow87.html>

ANEXO

Información técnica

Métodos utilizados para obtener los extractos

Por maceración con disolventes: Tres de los extractos empleados se obtuvieron por la maceración sucesiva con hexano, acetato de etilo y metanol. Estos se utilizaron de acuerdo a su polaridad, comenzando por el menos polar (hexano) hasta el más polar (metanol).

Para llevar a cabo las extracciones se pulverizaron 360g de *T. stans*. Estos se maceraron durante 24h (de forma exhaustiva) con los disolventes, de acuerdo al orden establecido, para obtener un filtrado por cada uno¹. Posteriormente, los extractos filtrados se recolectaron en matraces de bola para recuperar de ellos su respectivo extracto seco al separarlo del disolvente empleado por destilación reducida con un Rotavapor Büchi® (modelo R-205).

Por Infusión: El cuarto extracto se obtuvo a partir de 20g de *T. stans*, a los cuales se les agregó 300mL de agua destilada a punto de ebullición y se dejó reposar entre 20 y 30 minutos hasta alcanzar la temperatura ambiente y obtener la infusión mediante una filtración.

El filtrado obtenido se repartió en matraces de bola para ser congelados con nitrógeno líquido.

Los matraces congelados se conectaron a un Liofilizador HETO® (modelo FD3). El uso del liofilizador permitió que el filtrado congelado se separara, en agua destilada y en el extracto deshidratado, por sublimación.

Al finalizar la liofilización, se recuperó el extracto, en forma de polvo, en un recipiente con una espátula.

Cantidades utilizadas por extracto

Las cantidades que se emplearon fueron de 0.005, 0.05 y 0.5mg. Estas cantidades corresponden al 0.1%, 1% y 10% del volumen total de la mezcla.

Para manejar con mayor facilidad las concentraciones requeridas se optó por realizar una disolución *stock* [10 mg / mL] para cada extracto para tomar el volumen que contuviera la cantidad del extracto que se necesita.

¹ Entre cada maceración se secó la muestra de *T. stans* para evitar la mezcla entre disolventes.

Sustancias y cantidades utilizadas para la concentración del 10%.

Tratamiento	Sustancia	Volumen utilizado (mL)
<i>Hex</i>	disolución <i>stock</i>	0.05
	Etanol	0.15
	Tween 80	0.05
	agua destilada	4.75
<i>AcOEt</i>	disolución <i>stock</i>	0.05
	etanol	0.15
	Tween 80	0.05
	agua destilada	4.75
<i>MeOH</i>	disolución <i>stock</i>	0.05
	etanol	0.15
	Tween 80	0.05
	agua destilada	4.75
<i>Infusión</i>	disolución <i>stock</i>	0.05
	agua destilada	4.95

Sustancias y cantidades utilizadas para la concentración del 1%.

Tratamiento	Sustancia	Volumen utilizado (mL)
<i>Hex</i>	disolución <i>stock</i>	0.005
	etanol	0.15
	Tween 80	0.05
	agua destilada	4.795
<i>AcOEt</i>	disolución <i>stock</i>	0.005
	etanol	0.15
	Tween 80	0.05
	agua destilada	4.795
<i>MeOH</i>	disolución <i>stock</i>	0.005
	etanol	0.15
	Tween 80	0.05
	agua destilada	4.795
<i>Infusión</i>	disolución <i>stock</i>	0.005
	agua destilada	4.995

Sustancias y cantidades utilizadas para la concentración del 0.1%.

Tratamiento	Sustancias	Volumen utilizado (mL)
<i>Hex</i>	disolución <i>stock</i>	0.0005
	etanol	0.15
	Tween 80	0.05
	agua destilada	4.7995
<i>AcOEt</i>	disolución <i>stock</i>	0.0005
	etanol	0.15
	Tween 80	0.05
	agua destilada	4.7995
<i>MeOH</i>	disolución <i>stock</i>	0.0005
	etanol	0.15
	Tween 80	0.05
	agua destilada	4.7995
<i>Infusión</i>	disolución <i>stock</i>	0.0005
	Agua destilada	4.9995

Sustancias y cantidades utilizadas para los controles.

Tratamiento	Sustancias	Volumen utilizado (mL)
<i>Hex</i>	hexano	0.05
	etanol	0.15
	Tween 80	0.05
	agua destilada	4.75
<i>AcOEt</i>	acetato de etilo	0.05
	etanol	0.15
	Tween 80	0.05
	agua destilada	4.75
<i>MeOH</i>	metanol	0.05
	Etanol	0.15
	Tween 80	0.05
	agua destilada	4.75
<i>Infusión</i>	agua destilada	5

Mezcla para hidratar el medio instantáneo para *Drosophila* (Carolina Biological Supply Company)

Se prepara con: el extracto a probar (disuelto en su respectivo disolvente), un vehículo² conformado por etanol/Tween 80 (en una proporción de 3:1) y agua destilada. Este último compuesto se utilizó en mayor volumen dentro de la mezcla.

Para hidratar 1g de medio instantáneo para *Drosophila* se utilizaron 5mL de esta mezcla.

Medio de cultivo para cepas de *Drosophila*

Se prepara con: harina de maíz (105g), azúcar (70g), levadura de cerveza seca en polvo (66g), carragenina (10g), grenetina (5g) y agua (1250mL) (Rodríguez-Arnaiz *et al.*, 2005).

Frascos de vidrio

Medidas: 4cm de diámetro y 11.6cm de largo.

Sincronización de la F₁

Para fomentar la ovoposición de las hembras de la F₁ se le agrega al medio de cultivo levadura fresca.

Viales de polipropileno

Medidas: 2.3cm de diámetro y 9.3cm de largo.

Solución Fauré

Se prepara con: goma arábiga (30g), glicerol (20mL), hidrato de cloral (50mg) y agua destilada (50mL) (Graf *et al.*, 1984).

² El vehículo permite la miscibilidad entre los compuestos utilizados, al mismo tiempo que evita el rechazo del consumo del extracto por parte de *Drosophila melanogaster*.

... que ainsi soit-il.