



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

Valoración del efecto genotóxico de *Gnaphalium
conoideum* Kunth mediante el ensayo de mutación
y recombinación somática en *Drosophila
melanogaster*

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A:

ITZEL PAOLA ARGÜELLO CASTAÑEDA



DIRECTOR DE TESIS:
DRA. AMÉRICA NITXIN CASTAÑEDA
SORTIBRÁN

Ciudad Universitaria, CD. MX. 2017



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.

1. Datos de la alumna

Argüello
Castañeda
Itzel Paola
52197067
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología
308071032

2. Datos del tutor

Dra.
América Nitxin
Castañeda
Sortibrán

3. Datos del sinodal 1

Dr.
Javier Andrés
Juárez Díaz

4. Datos del sinodal 2

M en C.
Liliana
Sánchez Estrada

5. Datos del sinodal 3

M en C.
Marco Antonio
Carballo Ontiveros

6. Datos del sinodal 4

M en C
Horacio
Valdemar
Bárcenas
Rodríguez

7. Datos del trabajo escrito

Valoración del efecto genotóxico de *Gnaphalium conoideum* Kunth mediante el ensayo de mutación y recombinación somática en *Drosophila melanogaster*
38p.
2017

Dedicatoria

A Carla, mi compañera de vida; porque no tengo palabras para describir mi amor por ti.
Porque deseo que llegues más lejos que yo; más y más. Siempre.

Agradecimientos.

No sé como corresponder a la gente que ha hecho posible esto, a los que han participado activa o pasivamente, desde enseñarme, guiarme, corregirme, e incluso empujarme cuando me quedé estancada.

Quiero empezar contigo Ame, a quien respeto, admiro y aprecio, no sólo en un ámbito académico. Has sido el pilar central de este proyecto y definitivamente no lo habría culminado sin ti. Gracias por tu guía, tu paciencia, y enseñanza; por las horas y horas de tu tiempo que dedicaste y por no dejarme atrás.

También deseo agradecer a la Dra. Rosario Rodríguez Arnaiz y la M en C. Guadalupe Ordaz Téllez por su invaluable apoyo y por haber formado parte importante en mi formación académica.

A la M en C. Rosa María Fonseca por su valiosa ayuda con la identificación de la planta usada en este trabajo.

A Ricardo, Claudia y Ana porque de la manera más desinteresada y franca me enseñaron y estuvieron conmigo desde el principio. Gracias Fer, Viri y Jovana por su amistad y apoyo.

A todos los miembros de mi jurado, por sus comentarios, tiempo y apoyo; porque siempre se mostraron interesados en mi crecimiento y siempre se mostraron

A mi familia; mi hermana y mis padres, por su fé inquebrantable en mí, por fin lo logramos.

Martín, gracias por minimizar, suavizar y reconciliar mis batallas contra la computadora. Gracias amigos, por estar al pie del cañón, desde preguntarme ¿Cómo va la tesis? y estar en la banca gritando porras para mí. Carmen, Beto, Mario, Susi, Sandra, Luz, Fausto y Daniel.

Índice

I	RESUMEN	1
II	INTRODUCCIÓN	2
	<i>II.1 Gordolobo</i>	3
	<i>II.2 Metabolitos secundarios</i>	4
	<i>II.3 Toxicología</i>	5
	<i>II.4 Toxicología genética</i>	5
	<i>II.5 Dosis Letal Media</i>	6
	<i>II.6 Uso de la 4- nitroquinolina N-óxido como control positivo de genotoxicidad</i>	7
	<i>II.7 Antigenotoxicidad</i>	7
	<i>II.8 Drosophila melanogaster</i>	8
	<i>II.9 Discos imaginales</i>	9
	II.10 Ensayo de Mutación y Recombinación Somática (SMART)	10
	II.11 Clasificación del tipo de manchas	12
	<i>II.12 Mecanismos de formación de manchas</i>	13
III.	JUSTIFICACIÓN.	17
IV	OBJETIVOS.	18
	IV.1 Objetivo general.	18
	IV.2 Objetivos particulares.	18
V	HIPÓTESIS.	19
VI	MATERIALES Y MÉTODOS.	20
	<i>VI.1 Compuestos químicos empleados</i>	20
	<i>VI.2 Obtención de la planta.</i>	20
	<i>VI.3 Preparación de la decocción</i>	20
	<i>VI.4 Prueba de CL50</i>	20
	<i>VI.5 Control positivo</i>	21
	<i>VI.6 Cotratamiento con 4NQO</i>	21
	<i>VI.7 Ensayo SMART</i>	21
	<i>VI.8 Análisis de las muestras</i>	22
VII	RESULTADOS.	23
	<i>VII.1 Prueba de letalidad (CL₅₀)</i>	23
	<i>VII.2 Ensayo SMART.</i>	24
VIII.	DISCUSIÓN	30
IX.	CONCLUSIONES:	34
X.	BIBLIOGRAFÍA	35

I RESUMEN

La medicina tradicional sigue siendo un recurso terapéutico ampliamente usado en nuestro país. Una de las plantas más empleadas es el gordolobo. En México se conoce con este nombre a varias especies de diferentes géneros. Una de las especies más comunes y fáciles de encontrar es *Gnaphalium conoideum* Kunth.

Existen registros de diferentes actividades farmacológicas para el género *Gnaphalium*, tales como antioxidantes, antibacteriales, antifúngicos y expectorante, por mencionar algunas. En la medicina tradicional mexicana, *G. conoideum* se usa para aliviar la tos, asma y bronquitis; además de poseer propiedades relajantes. Su modo de empleo es mediante la cocción de sus flores y frutos. Sin embargo, no existen estudios que determinen su genotoxicidad.

El ensayo de mutación y recombinación somática (SMART) en el ala de *Drosophila melanogaster* evalúa el potencial genotóxico de un agente al analizar la pérdida de heterocigocidad en las células somáticas. Esto indica que eventos ocurridos durante la mitosis tuvieron repercusión sobre la integridad del DNA.

En este trabajo se evaluó el potencial genotóxico de *G. conoideum* a través del ensayo SMART en ala de *D. melanogaster*. Se utilizó la planta en una decocción en cuatro diferentes concentraciones (2.5%, 5%, 7.5% y 10%), usando como positivo 4NQO. Adicionalmente, se realizó un cotratamiento de 4NQO con la concentración más alta de la decocción para determinar si posee un efecto antigenotóxico.

Se utilizaron dos cruza de *D. Melanogaster* para evaluar esta planta: la cruza de alta bioactivación (HB) y la cruza estándar (ST). Se expusieron a larvas de 72 horas \pm 3 horas a los diferentes tratamientos. Se registró la frecuencia, el tipo y el tamaño de manchas presentes en las alas de los adultos. Los datos se analizaron mediante el programa SMART v2.0 (Frei y Würigler, 1988) y con base en este análisis estadístico, se concluyó que mediante este ensayo, la decocción de *G. conoideum* Kunth no mostró un efecto genotóxico ni tampoco mostró tener un efecto antimutágeno en el cotratamiento con 4NQO.

II INTRODUCCIÓN

La medicina tradicional se remite a una herencia cultural, en donde se hace uso de las plantas medicinales provenientes de los recursos naturales propios de la región y de prácticas médicas populares. Este conocimiento se genera en el seno de una población y se mantiene generacionalmente por vía oral. La medicina tradicional es ampliamente usada, también como tratamiento simultáneo a la medicina alópata o como recurso terapéutico (Taddei-Bringas y Santillana-Macedo, 1999).

Los primeros registros escritos de las medicinas elaboradas derivadas de plantas datan de Mesopotamia hacia 2600 A.C (Newman *et al.*, 2008).

Hoy en día, la etnobotánica se encarga del estudio científico del empleo de plantas en las culturas nativas, incluyendo su uso como medicina. Esta ciencia empezó con los estudios de Carolus Linneo, quien publicó *Flora lapponica* en la década de 1730. Sus observaciones, como muchas de las que se han hecho desde entonces, recurren al conocimiento del mundo natural, acumulado a lo largo de muchas generaciones por los pueblos indígenas. Estas aportaciones continúan contribuyendo significativamente a la práctica de la actual (Newman *et al.*, 2008). En la actualidad tenemos muchos ejemplos de medicamentos cuyos principios activos provienen de metabolitos de plantas usadas en medicina tradicional.

La planta comúnmente conocida en nuestro país con el nombre de Gordolobo se encuentra entre las especies más utilizadas en la medicina tradicional mexicana, en esta lista también se encuentra el árnica, el cuachalalate, la tila, la salvia, la cola de caballo y el boldo (García de Alba *et al.*, 2012).

Los padecimientos que con mayor frecuencia se atienden haciendo uso de plantas son aquellos relacionados con el aparato respiratorio como la tos, gripa o bronquitis, siguiendo el orden en la lista también es frecuente tratar padecimientos del aparato digestivo, fiebre, dolor de cabeza y reumas. (Betancourt *et al.*, 2000).

II.1 Gordolobo

En la región central del país se aplica el nombre de Gordolobo a distintas especies de diferentes géneros; sin embargo, todas están indicadas en el tratamiento tradicional de enfermedades respiratorias como la gripe y la bronquitis, así como para aliviar algunos síntomas de ellas como lo es la tos. Su modo de uso es a través de la administración de un cocimiento de las flores y las hojas de esta planta que se puede endulzar con miel y beber mientras se encuentra caliente, de preferencia por las noches. Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana (BDMTM). 2009. Atlas de las plantas de la medicina tradicional mexicana. Obtenido de:

<http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/monografia.php?l=3&t=&id=7483>, 08 de mayo del 2014. Castillo, F., Hernández, D., Gallegos, G., Méndez, M., Rodríguez, R., Reyes, A. y Aguilar, C. N

Según los datos arrojados en un estudio llevado a cabo en algunas regiones de Puebla como Tzinacapan y Zoquipan el gordolobo está entre las 47 plantas más usadas en medicina tradicional. Esta planta también ocupa un lugar en la lista de otras regiones del mismo estado como Loma Bella, Xonalpu, Cinco de mayo, Coxcatlán, Tulcingo del Valle (Betancourt *et al.*, 2000).

En el Estado de México, así como en la Ciudad de México, Michoacán, Tabasco, Guanajuato, Jalisco, Hidalgo, Puebla y Querétaro es común encontrar el género *Gnaphalium*. Muchas especies de este género se cultivan y comercializan como plantas medicinales, aunque también existen poblaciones silvestres y se encuentran en algunos huertos familiares (observación personal; Gómez-Álvarez, Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana 2012). Lo anterior facilita acceder a ellas.



Figura 1. Mapa que muestra los estados en los que se encuentra el género *Gnaphalium*.

El gordolobo es una planta nativa usada principalmente para aliviar padecimientos del aparato respiratorio. Existen diferentes especies de gordolobo; la mayoría es utilizada en la zona centro y centro-sur de nuestro país (Betancourt *et al.*, 2000).

Entre las especies comúnmente comercializadas se encuentra *Gnaphalium conoideum* Kunth, esta planta es usada como tratamiento para la tos, el asma y la bronquitis además de presentar propiedades relajantes (García de Alba *et al.*, 2012) también presenta propiedades desinflamantes, expectorantes y emolientes (Betancourt *et al.*, 2000).

En la Ciudad de México se puede encontrar en diferentes mercados como lo son: el mercado de Portales, Sonora, y Coyoacán; por mencionar algunos. Por ser una planta de uso común y de fácil acceso, se decidió abordar su estudio.

G. conoideum Kunth es una planta herbácea con tallos y hojas aterciopeladas, las hojas son largas y angostas, pegadas al tallo, con flores dispuestas en cabezuelas, con frutos en forma de cápsulas alargadas y mide entre 30 y 80 cm. Su clasificación taxonómica es la siguiente:

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Orden: Asterales

Familia: Asteraceae

Género: *Gnaphalium*

Especie: *Gnaphalium conoideum* Kunth.

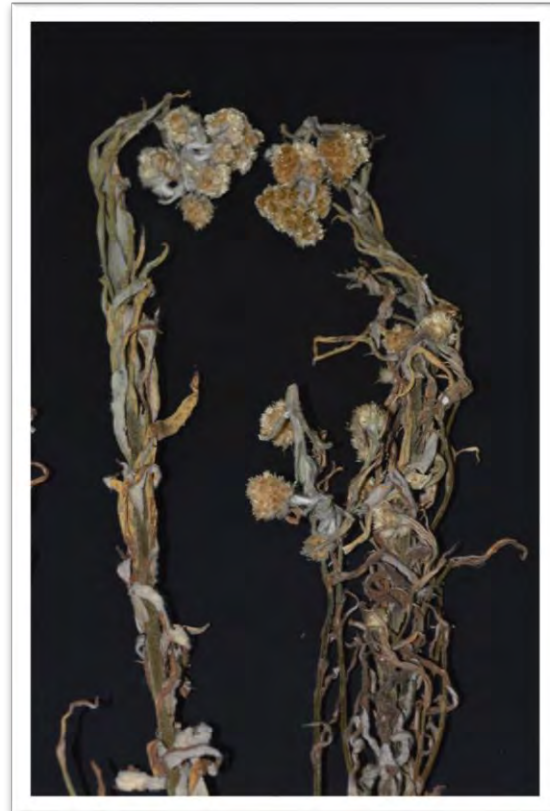


Figura 2. *Gnaphalium conoideum* Kunth. Tomada por Paola Argüello

(Colecciones biológicas UNIBIO

<<http://unibio.unam.mx/irekani/handle/123456789/14439?proyecto=Irekani> >).

Se han aislado más de 125 constituyentes químicos del género *Gnaphalium*, entre ellos; flavonoides, sesquiterpenos, diterpenos, triterpenos y fitosteroles; entre otros componentes. Se ha demostrado que los extractos de este género, así como los compuestos aislados del mismo, poseen múltiples actividades farmacológicas, tales como antioxidantes, antibacteriales, antifúngicos, antitusígeno y expectorante; por mencionar algunas (Zheng *et al.*, 2013).

II.2 Metabolitos secundarios.

Las plantas poseen dos tipos de metabolismo: el primario y el secundario. Del metabolismo primario derivan aquellos metabolitos que participan como intermediarios de las rutas bioquímicas. Estos procesos son esenciales para la célula y, en general para la planta ya que

cubren funciones básicas tales como componentes estructurales de la membrana de los pigmentos fotosintéticos, procesos respiratorios, asimilación de nutrientes, o síntesis de proteínas, por mencionar algunas . (Pérez-Urritia y Ávalos-García, 2009).

Por otro lado existen rutas que conducen a la formación de compuestos conocidos como metabolitos secundarios. Éstos no cumplen una función esencial en la planta (Pérez-Urritia, y Ávalos-García 2009). Sin embargo, confieren una clara ventaja selectiva interviniendo en las interacciones ecológicas entre la planta y el ambiente. Pueden estar relacionados con funciones como la atracción a polinizadores o en la defensa química contra el daño que ocasionan factores bióticos o abióticos (Sepúlveda *et al.*, 2003). Entre estos metabolitos también se encuentran compuestos venenosos, como alcaloides, glucósidos y cianogénicos, cuya concentración en las células es relativamente baja. Cuando las plantas se encuentran bajo condiciones como la depredación por herbivoría, ataque de microorganismos, competencia por espacio de suelo, se induce una síntesis activa de metabolitos secundarios. (Sepúlveda *et al.*, 2003).

Las plantas no cuentan con un mecanismo de excreción, por lo que acumulan todos los residuos de sus reacciones metabólicas. Los compuestos solubles en agua se almacenan en vacuolas y los solubles en lípidos se encuentran en estructuras especializadas como pelos glandulares, tricomas o en la cutícula. (Wink, 1999 en Sepúlveda *et al.*, 2003). Esta es la razón por la que al consumirlas se ingieren también los metabolitos secundarios que la planta ha acumulado, pudiendo causar un efecto tóxico.

II.3 Toxicología

La toxicología es la disciplina encargada de la identificación y la cuantificación de los efectos adversos asociados a la exposición de agentes físicos y sustancias químicas (Silbergeld, 1998). Abarca desde estudios de investigación básica sobre el mecanismo de acción de los agentes tóxicos hasta la elaboración e interpretación de pruebas normalizadas para determinar las propiedades tóxicas de los agentes. Es un componente crucial de las estrategias de prevención, es ya un elemento importante de salud ambiental y salud en el trabajo, pues proporciona información sobre peligros potenciales. Desempeña un papel importante en la elaboración de normas y otras medidas de salud profesional. Además, los estudios toxicológicos pueden proporcionar una información precisa sobre la dosis y la respuesta en condiciones controladas de laboratorio (Silbergeld, 1998).

II.4 Toxicología genética

Algunos agentes tóxicos son capaces de interactuar con el material genético de los organismos, estos agentes son el objeto de estudio de la Toxicología genética, la cual pretende establecer la correlación que existe entre la exposición de las células germinales y/o las células somáticas a un agente en particular con el fin de definir su efecto sobre la integridad genética del material hereditario (Rodríguez-Arnaiz, 1994).

La toxicología genética se ha encargado de identificar agentes mutagénicos y de cuantificar el peligro que estos agentes representan como inductores de daño genético (Vettorazzi y

Ginebra, 1992). Los agentes genotóxicos se definen como aquellos que causan daño al material genético a dosis subtóxicas (ICCPMC, 1983 en Cuenca y Ramírez, 2004).

Actualmente existe una gran cantidad de técnicas de laboratorios para detectar eventos mutagénicos, así como también existen múltiples ensayos genéticos. Esta variedad abarca desde sistemas *in vitro*, como el ensayo de micronúcleos, el ensayo del letal dominante que utiliza hongos, el ensayo de reversión de la histidina en bacterias (como la prueba de Ames) y cultivos de células de mamíferos, hasta sistemas *in vivo*, como el ensayo de micronúcleos, el ensayo letal dominante y los ensayos de aberraciones cromosómicas. Sin embargo, existen diferencias entre los diversos mecanismos moleculares a través de los cuales se puede inducir el daño genético. Por esta razón, ningún ensayo genético actual, tomado individualmente, es capaz de revelar todos los mecanismos (Vettorazzi, y Ginebra, 1992).

A finales de los años 70, se demostró que existe una correlación entre la inducción de mutaciones (mutagénesis) causadas por diversos agentes químicos y el desarrollo de algunos tipos de cáncer (carcinogénesis). Esto se debe a que la mayoría de los carcinógenos interactúan directa o indirectamente con los ácidos nucleicos, por lo que poseen la capacidad de producir cambios heredables. Los cambios generados en los gametos pueden provocar esterilidad en el individuo portador o pueden fijarse en el material genético y heredarse. Si las mutaciones se producen en células somáticas, puede conducir al desarrollo de enfermedades o iniciar un proceso canceroso en el organismo (Rodríguez-Arnaiz, 1994).

II.5 Dosis Letal Media

En el caso de una sustancia desconocida, las investigaciones generalmente se inician con ensayos de toxicidad aguda. El objetivo es obtener datos sobre los efectos producidos en el organismo después de una única exposición al xenobiótico (Vettorazzi y Ginebra, 1992).

La *relación dosis efecto*, es una relación a nivel individual, donde un incremento en la dosis puede aumentar la intensidad de un efecto o su gravedad. La *relación dosis respuesta*, es la relación entre la dosis y el porcentaje de individuos que presentan un determinado efecto (Silbergeld, 1998).

La dosis suele definirse como la cantidad de un xenobiótico que entra en un organismo. La dosis letal media (LD₅₀, por sus siglas en inglés) es un parámetro que se toma como índice de toxicidad de una sustancia y se define como la dosis que produce una mortalidad del 50% de la población expuesta. Usualmente se usan ratas o ratones y en general, las cantidades de sustancia requeridas para matar animales de diferentes especies están relacionadas con el peso de los animales. Por esta razón la DL₅₀ se reporta comúnmente como la cantidad de sustancia por kilogramo de peso del animal. La LC_{(t)50} (Concentración Letal media por unidad de tiempo) es una medida similar, pero la diferencia radica en que la DL₅₀ administra una cantidad específica por organismo y la LC_{(t)50} administra el xenobiótico de manera indirecta al medio en donde se encuentran los organismos de estudio sin tomar en cuenta la talla y peso de los mismos (Royal Society of Chemistry, 2001).

II.6 Uso de la 4- nitroquinolina N-óxido como control positivo de genotoxicidad

El 4-nitroquinolina N-óxido (4NQO) se utiliza como control positivo en varios ensayos de genotoxicidad, ya que este compuesto y sus derivados son conocidos por sus propiedades carcinogénicas y mutagénicas (Brüsehaffer *et al.*, 2015), además de ser uno de los modelos de carcinogénesis animal más usados al afectar varios órganos (Tada y Tada, 1971; Grawish *et al.*, 2011). El 4NQO es capaz de generar papilomas, carcinomas, fibrosarcomas y linfomas en varios organismos como, ratones, ratas, hámsters, conejillo de indias y conejos.

El 4NQO es conocido por imitar los efectos de la luz ultravioleta en varios organismos, tiene la capacidad de unirse covalentemente al DNA produciendo aductos en el material genético (Ikenaga *et al.*, 1975; Castañeda-Sortibrán, *et al.*, 2015).

Se sabe que el 4NQO, además de reaccionar con el DNA, induce estrés oxidativo generando especies reactivas al oxígeno (ROS), como el radical superóxido (O_2^-) o el peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Se cree que estos radicales se derivan de la reducción enzimática del grupo nitro del 4NQO. Este compuesto necesita metabolizarse por la maquinaria celular, de modo que el metabolito secundario que se genera es capaz de unirse covalentemente al DNA, especialmente con la adenina y la guanina. Estos agentes secundarios pueden causar daño al DNA o dañar otros componentes celulares que pueden alterar las rutas metabólicas y causar estrés oxidativo (Nunoshiba y Demple, 1993; Brüsehaffer *et al.*, 2015; Castañeda-Sortibrán, *et al.*, 2015).

Se ha mostrado la genotoxicidad del 4NQO por el ensayo SMART en ala de *Drosophila melanogaster* en la cruce estándar (Graf, 1997) y en la cruce de alta bioactivación (Heres-Pulido *et al.*, 2004; Castañeda-Sortibrán, *et al.*, 2015).

II.7 Antigenotoxicidad

Los antimutágenos y anticarcinógenos participan de manera importante en combatir la acción de factores que están relacionados con el cáncer. Se esperaría que los agentes inhibidores de mutagénesis actúen también como inhibidores de carcinogénesis (Karekar *et al.*, 2000).

Un amplio número de ensayos de genotoxicidad se han usado también para evaluar la antigenotoxicidad, entre los cuales está el ensayo SMART en *D. Melanogaster*, que ha resultado ser muy eficiente y sensible para este tipo de estudios. Los compuestos químicos y las mezclas se analizan a través de tratamientos crónicos para la valoración de su antigenotoxicidad. Para este tipo de estudios se pueden usar cotratamientos crónicos, así como pretratamientos (Graf *et al.*, 1997).

II.8 *Drosophila melanogaster*

La mosca de la fruta *D. melanogaster* ha sido ampliamente estudiada durante décadas acompañando a los genetistas en el establecimiento de diversos conceptos, mecanismos y procesos. Se introdujo como organismo experimental hace aproximadamente un siglo y los estudios realizados con este organismo han sido cruciales para el desarrollo de la genética y campos relacionados (Sepel y Loreto, 2010). Este organismo presenta ciertas ventajas sobre otros modelos, tales como son:

- bajo costo de mantenimiento
- corto tiempo generacional
- progenie numerosa
- genética y biología molecular bien conocidas

Una generación dura aproximadamente 10 días a 25°C (Figura 3). Las hembras almacenan el esperma en el receptáculo seminal o spermateca, para la fecundación de cientos de huevos que posteriormente serán ovipositados durante varios días. Si se encuentran a 25°C, el desarrollo del huevo dura alrededor de 21 horas. Cuando el huevo eclosiona, atraviesa por tres estados larvales. El estadio más largo es el tercero, el cual se alcanza a las 72 horas de vida posteriormente se continúa con la etapa de forrajeo para así migrar al estadio de pupa para pupar (Prokop, 2013). Durante las etapas de pupa se forman las estructuras de la mosca adulta. Posteriormente, la mosca emerge y alcanza su madurez sexual después de 8 horas (Prokop, 2013). En medios de cultivo sintéticos, se utiliza levadura fresca para estimular su oviposición, ya que en la naturaleza, *D. melanogaster*, es atraída por la fruta fermentada (Becher *et al.*, 2012).

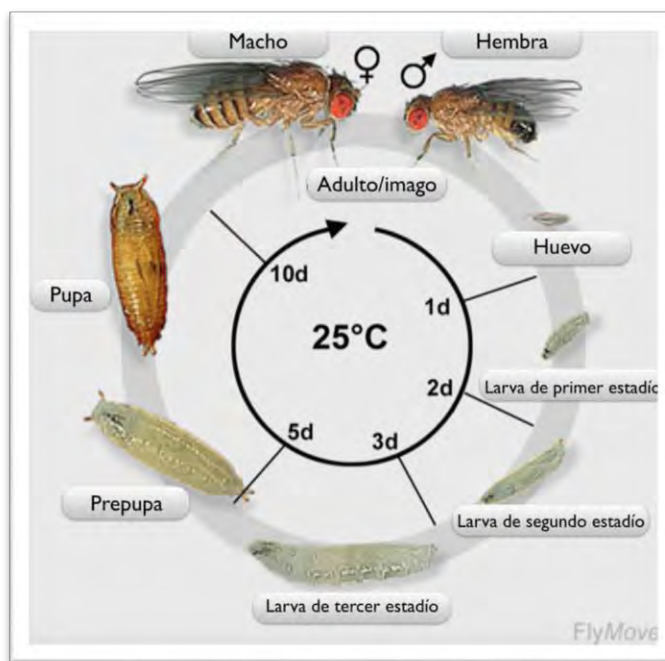


Figura 3 Ciclo de vida de *Drosophila melanogaster*. Modificado de (Weigmann., et al., 2003).

D. melanogaster comparte con los mamíferos muchas características biológicas, bioquímicas, neurológicas, fisiológicas y posee sistemas sofisticados y complejos que son comparables a las funciones equivalentes al corazón, riñón, intestino y pulmón (Pandey y Nichols, 2011). Además, su sistema nervioso responde a muchas drogas de manera similar a como lo hace el de los mamíferos (Pandey y Nichols, 2011) y se ha demostrado que las enzimas de los citocromos P450 de *D. melanogaster* son similares a las encontradas en la fracción S9 del hígado de mamíferos (Clark, 1982; Hällström *et al.*, 1984).

El 75% de las enfermedades humanas causadas por genes tienen un homólogo funcional en *D. melanogaster*. Por ejemplo, de los genes que se sabe han mutado o se han suprimido en enfermedades humanas, por lo menos el 60% se encuentran en *Drosophila* (Chivian *et al.*, 2008). También ha sido esencial para la identificación de genes involucrados en varios procesos biológicos, un ejemplo de esto es la función del gen p53, que codifica una proteína vital para la protección de las células en contra del desarrollo de cáncer. Esta proteína tiene la capacidad de detectar daños en el DNA en una célula a punto de someterse a división celular y de activar en la célula los procesos de reparación del DNA. Si este DNA está demasiado dañado para ser reparado, la proteína p53 dirige la célula a apoptosis (Chivian *et al.*, 2008).

Los compuestos químicos pueden ser administrados a *D. melanogaster* mediante diferentes vías dependiendo del tipo de estudio, la naturaleza del xenobiótico y la fase de desarrollo de la mosca. En el estado larvario, el xenobiótico puede añadirse al medio sólido para exposiciones prolongadas o a un medio con levadura para exposiciones cortas (Abolaji *et al.*, 2013).

II.9 Discos imaginales

El cuerpo de la larva de *D. melanogaster* está conformado por dos tipos de tejido: el larval y el de los discos imaginales. (Figura 4). Los discos imaginales corresponden a un tejido que crece de forma autónoma mediante la constante divisiones mitóticas constantes las cuales son asincrónicas con respecto al crecimiento y la división del tejido larvario.

Los discos imaginales están formados de unas 50 a 100 células en el primer estado larval. Sin embargo, este número aumenta a 30,000 en la pupa temprana, cuando inicia la diferenciación de las alas (Ransom, 1982). La proliferación celular durante el desarrollo de la larva da lugar a un elevado número de células blanco, presentes en los discos imaginales (Graf, 1995). Las células blanco del ensayo SMART son las que se encuentran en los discos imaginales de ala (Graf *et al.*, 1984).

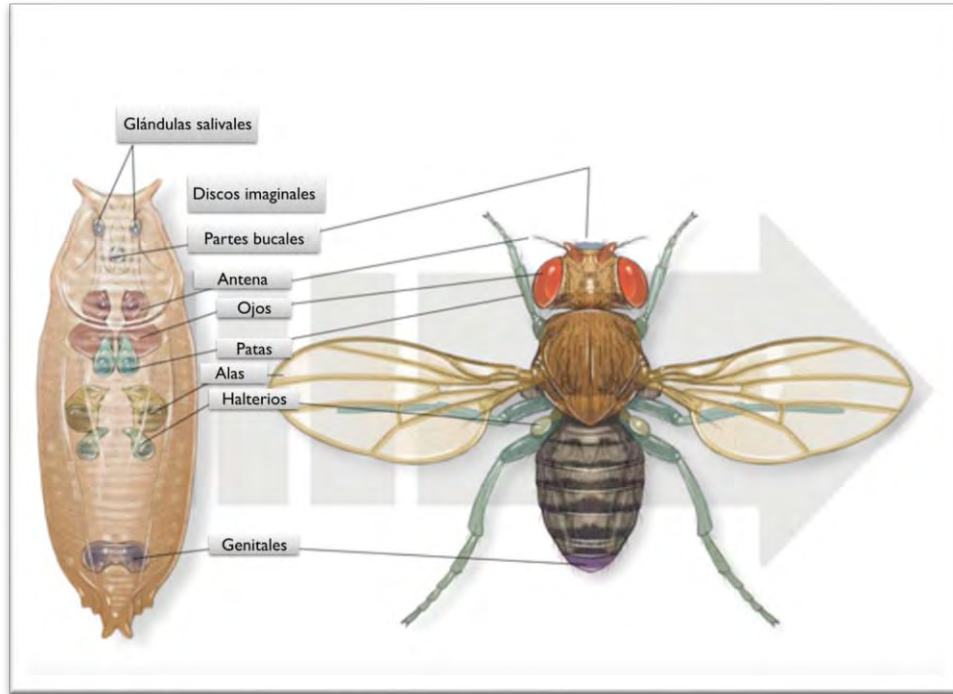


Figura 4. Discos imaginales de *Drosophila melanogaster*. Modificado de The Scientist.

II.10 Ensayo de Mutación y Recombinación Somática (SMART)

El ensayo de Mutación y Recombinación Somáticas (SMART por sus siglas en inglés) en el ala de *Drosophila melanogaster* (Graf *et al.*, 1984) es un ensayo *in vivo* que evalúa el potencial genotóxico de un agente químico al analizar la pérdida de heterocigosis, resultado de mutaciones puntuales, deleciones, recombinaciones, reglos cromosómicos, rompimiento o pérdida cromosómica. Este bioensayo hace uso de marcadores recesivos en las células de las alas *mwh* (multiple wing hairs) y *flr³* (flare) en moscas transheterocigotas *mwh⁺ / +flr³*. Estos dos marcadores recesivos se encuentran en el brazo izquierdo del cromosoma 3 (Graf, 1994). La mutación recesiva *mwh* altera el número de tricomas que se manifiestan expresados por célula; a diferencia del fenotipo silvestre, que sólo presenta un tricoma por célula, este marcador expresa tres o más tricomas por célula. El marcador *flr³* es letal en homocigosis, este alelo necesita la presencia de los balanceadores cromosómicos TM1 y TM3 (Vogel, 1992).

Cuando una alteración genética es inducida en una célula en división mitótica en un disco imaginal de ala, éste puede dar lugar a manchas *mwh* y/o *flr³* en la superficie visible del ala de la mosca adulta. El total de manchas inducidas en un grupo en moscas proveen datos cuantitativos acerca de la actividad genotóxica de un compuesto. (Graf, *et al.*, 1998). La capacidad de esta prueba de detectar la recombinación somática hace que sea de gran interés para la identificación de agentes potencialmente carcinógenos (Rodrigues de Andrade, 2004). Este ensayo también detecta la actividad de promutágenos mediante el uso de la cruce de alta bioactivación, que tiene la capacidad de transformar algunos carcinógenos a sus metabolitos

activos (Graf y van Schaik, 1992).

Dos de las cruza que se pueden utilizar en este ensayo son la cruza estándar y la cruza de alta bioactivación. La primera es capaz de detectar “progenotoxinas” en metabolitos reactivos diferencia de la cruza de alta bioactivación, que se caracteriza por tener altos niveles de citocromos P450 (Hällström y Blanck, 1985 en Graf y van Schaik, 1992) por esta razón los promutágenos muestran una actividad genotóxica mayor cuando son expuestos a esta cepa, en comparación a la cruza estándar (Graf y van Schaik, 1992).

El ensayo SMART ha probado ser lo suficientemente sensible para establecer la relación entre la estructura química de un xenobiótico y la respuesta mutagénica y además nos ofrece un extenso tamaño de muestra de gran importancia estadística (aproximadamente 30,000 células por mosca) (Rodrigues de Andrade *et al.*, 2004). También permite elegir tanto la ruta de administración, como el tiempo de exposición pudiendo ser agudo (larvas de tercer estadio tratadas de 2 a 6 h) o crónico (larvas de tercer estadio expuestas 48 h). La relación entre la edad de las larvas y el tamaño de las manchas sencillas, radica en el tiempo de exposición al xenobiótico, ya que las manchas pequeñas (una o dos células) se producen durante la última ronda de división celular en la larva de tercer estadio, mientras que las manchas grandes (mayores a tres células) se producen en larvas de segundo y tercer estadio (72 h) (Rodrigues de Andrade *et al.*, 2004). Esta relación no existe cuando se trata de manchas gemelas, éstas aparecen esporádicamente sin importar la edad de las larvas expuestas. Por estas razones, la edad óptima de las larvas para llevar a cabo este ensayo es de 72h (Graf y van Schaik, 1992).

La cruza estándar de *D. melanogaster*, que expresa niveles basales de citocromos P450, es capaz de detectar “genotoxinas” que funcionan como metabolitos reactivos de acción directa. Por otro lado, la cruza de alta bioactivación se caracteriza por tener altos niveles de citocromos P450 (Hällström y Blanck, 1985) debido a la sobreexpresión constitutiva de los genes que los codifican, razón por la cual los promutágenos muestran una actividad genotóxica mayor cuando son expuestos a esta cruza, en comparación a la cruza estándar (Graf y van Schaik, 1992). Por lo que la cruza de alta bioactivación detecta genotoxinas de acción indirecta.

Este bioensayo presenta varias ventajas. Las preparaciones de alas realizadas son permanentes y de esta forma se pueden verificar y reconsiderar los datos con el material original, tanto en laminillas como en organismos fijados en etanol al 70%. Otra ventaja es que en cada disco imaginal, se encuentran miles de células blanco que están expuestas (Graf *et al.*, 1984), por lo que el tamaño de muestra abarca cerca de 3,000,000 de células, lo cual representa un buen tamaño de muestra para los posteriores análisis estadísticos.

II.11 Clasificación del tipo de manchas

Dependiendo del mecanismo de formación de manchas que se haya llevado a cabo dentro de la célula, podremos encontrar los siguientes fenotipos.

Silvestre.

Este fenotipo está representado por un tricoma por cada célula que conforma el ala de *D. melanogaster*.

mwh

En esta categoría están todas las células que contienen tres o más tricomas por célula en lugar de uno, como es el caso del fenotipo silvestre

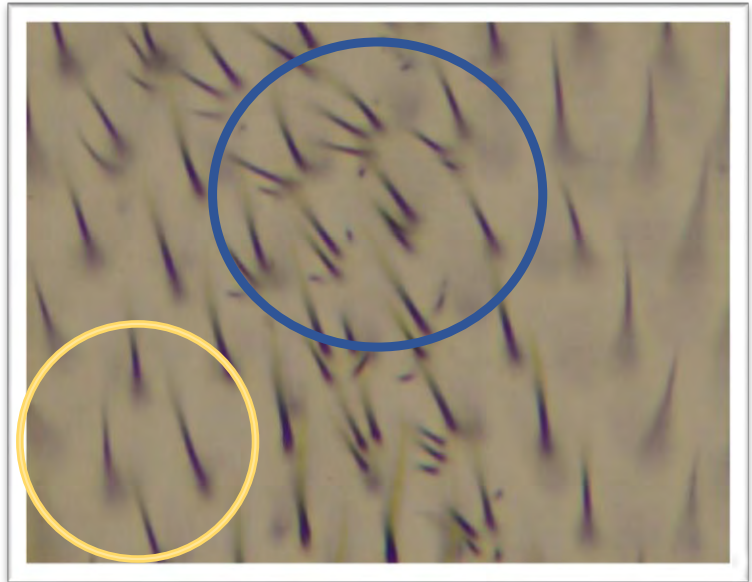


Figura 5. Fotografía de ala de *Drosophila melanogaster* a 40x en microscopio Leica, donde se muestra el fenotipo *mwh* y silvestre. Tomada por Paola Argüello.

flr³

El alelo *flr³* no se expresa completamente en clones menores a 4 células. En manchas grandes, *flr³* presenta una expresión variable. Puede ser puntiaguda, acortada, tricomas cortos o amórficos, algunas veces puede presentar forma de globo de material quitinoso melanótico.

gemelas

Estas manchas expresan el fenotipo *flr³* y el *mwh*. Estas manchas expresan el fenotipo *flr³* y el *mwh*. Aparecen raramente en los controles negativos, por lo que no presentan una dificultad en el análisis estadístico.

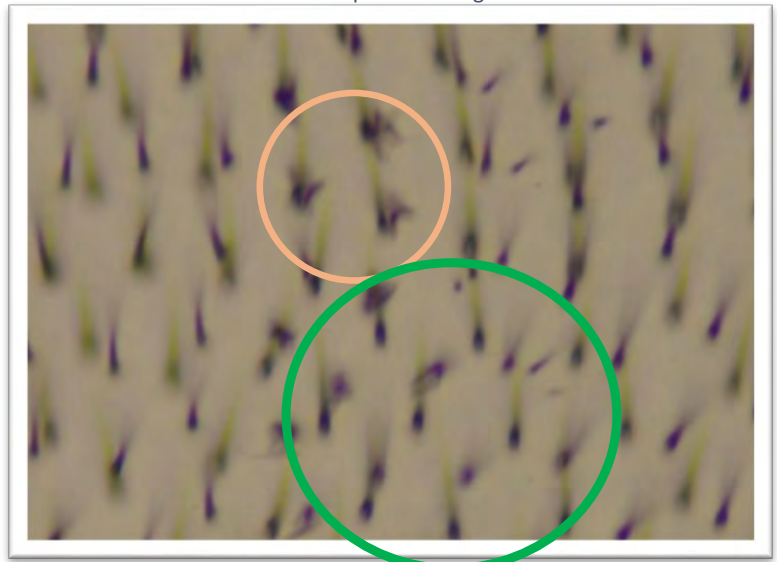


Figura 6.. Fotografía de ala de *Drosophila melanogaster* a 40x en microscopio Leica, donde se muestra el fenotipo *flr³* y mancha gemela. Tomada por Paola Argüello.

En teoría, el tamaño de la mancha refleja el número de divisiones celulares que ocurrieron después de la inducción del cambio genético en la línea celular. Todas las células en un clon se dividen a la misma tasa, por lo que el tamaño de la mancha debería reflejar directamente el número de divisiones en un intervalo de 2^0 a 2^n células (Graf *et al.*, 1984). Por esta razón, se clasifican las manchas de la siguiente manera: 1, 2, 3-4, 5-8, 9-16, 17 -32.

II.12 Mecanismos de formación de manchas

En las siguientes figuras se muestran los diferentes mecanismos (deleción, mutación puntual, recombinación y no disyunción) por los cuales se pueden formar y manifestar los diferentes tipos de manchas en las alas de las moscas.

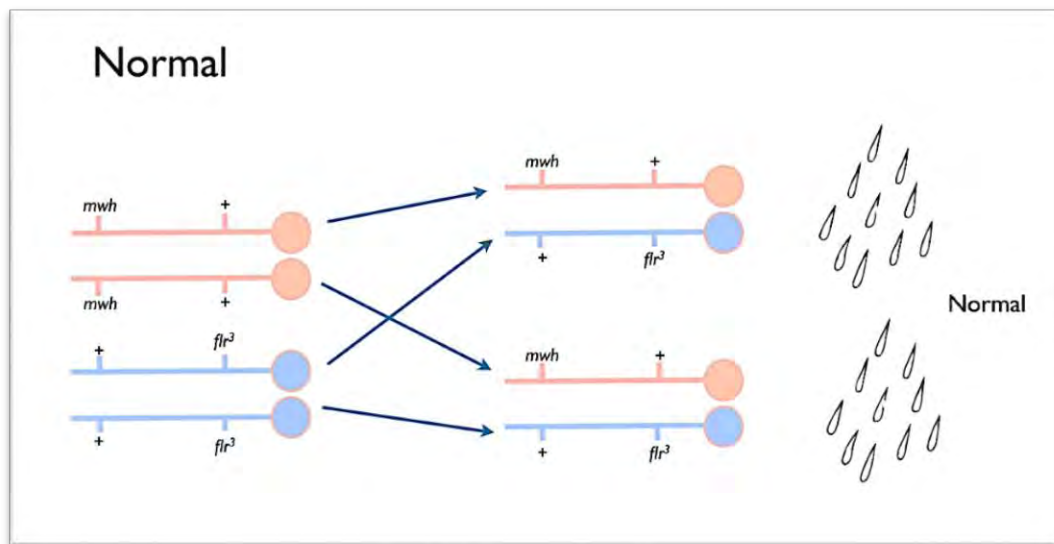


Figura 7. Diagrama representando dos células derivadas de mitosis que expresan el mismo fenotipo que la célula progenitora, en ausencia de algún evento mutagénico. Elaborada por Paola Argüello

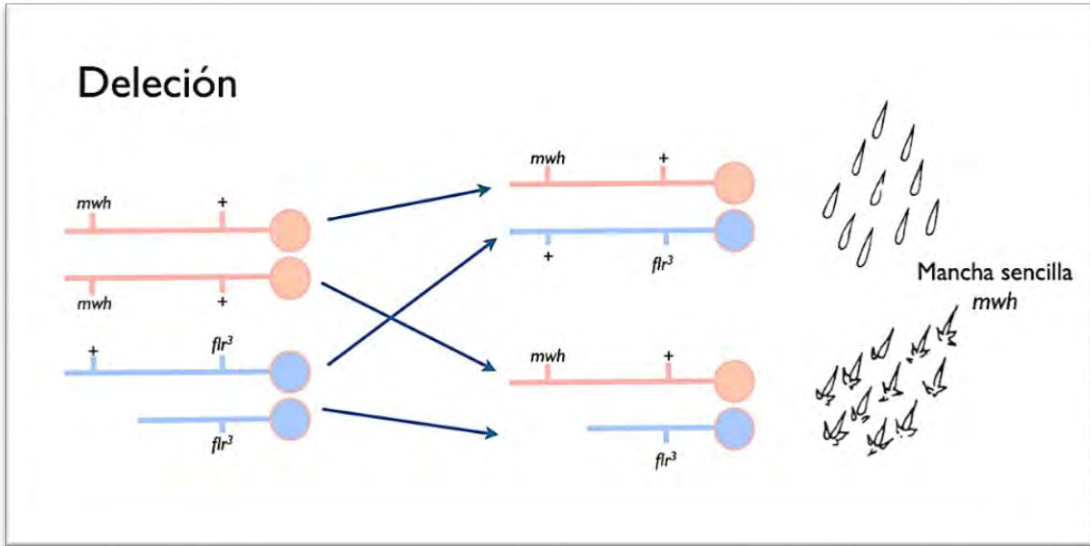


Figura 8. Diagrama representando dos células derivadas de mitosis donde una expresa fenotipo diferente al de la célula progenitora debido a un evento de delección. Elaborada por Paola Argüello

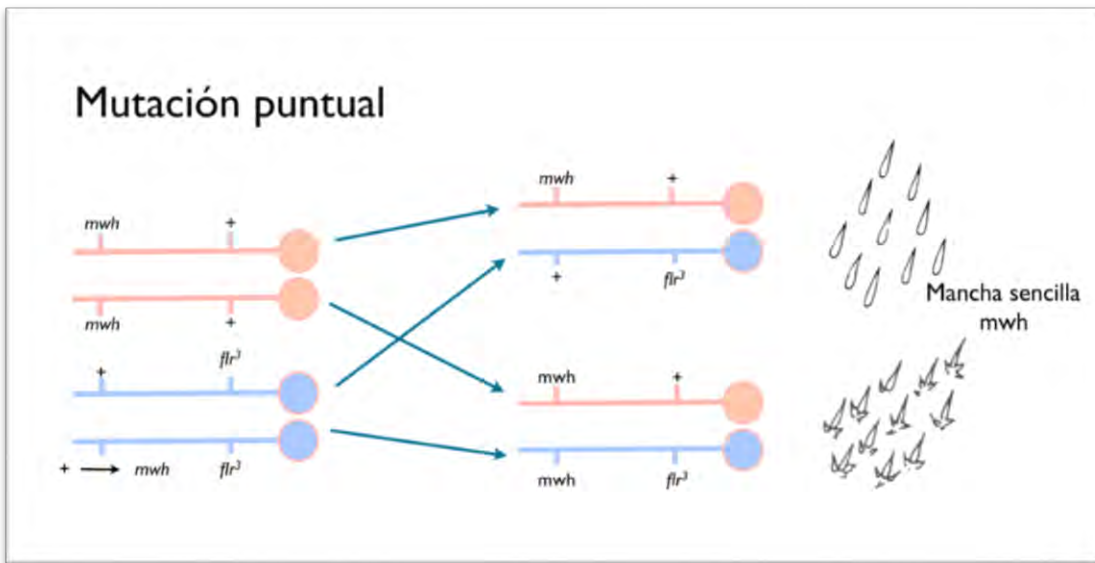


Figura 9. Diagrama representando dos células derivadas de mitosis donde una expresa fenotipo diferente al de la célula progenitora debido a un evento de mutación puntual donde el alelo de fenotipo silvestre es reemplazado por *mwh*. Elaborada por Paola Argüello

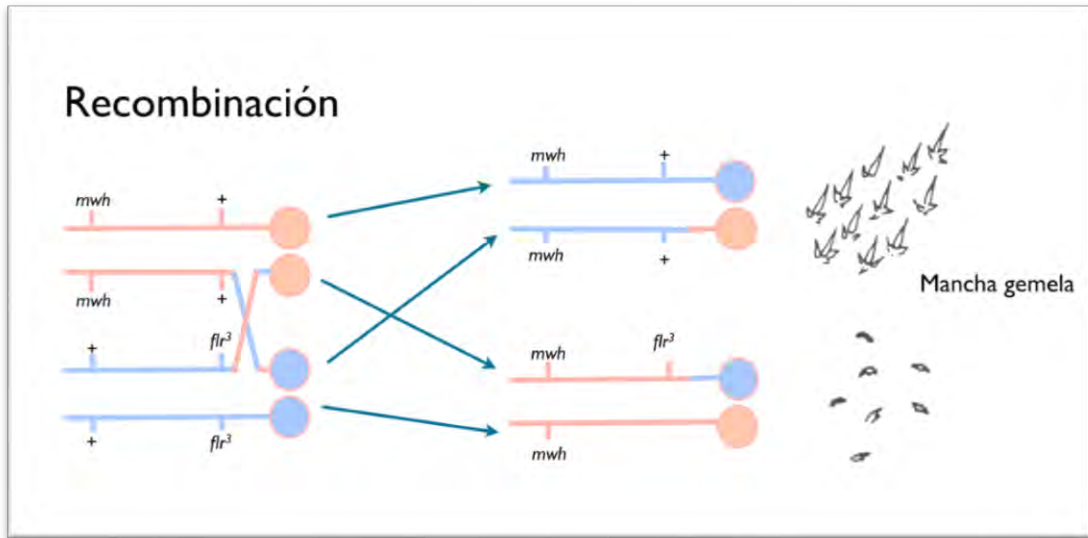


Figura 10. Diagrama representando dos células derivadas de mitosis donde ambas células hijas expresan fenotipo diferente al de la célula progenitora debido a un evento de recombinación genética cercana al centrómero .
Elaborada por Paola Argüello

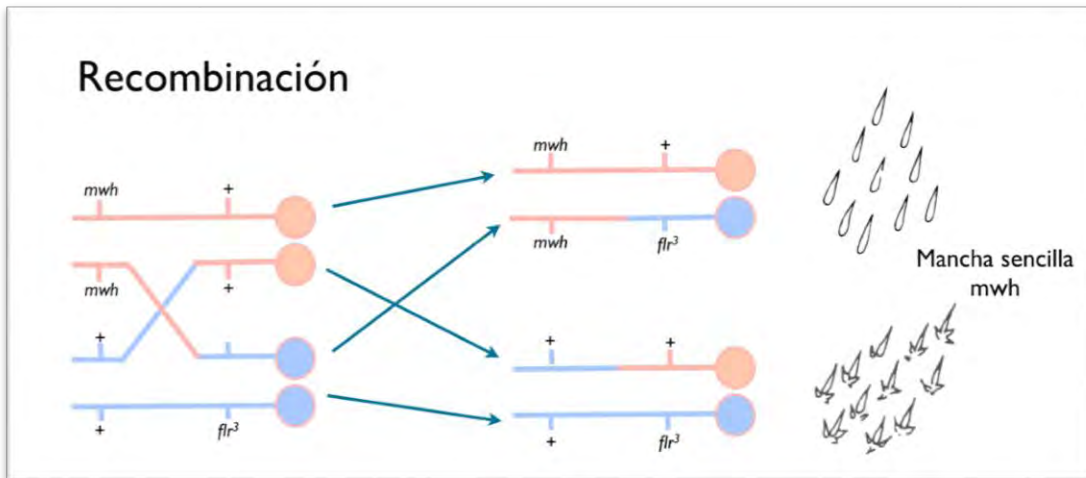


Figura 11. Diagrama representando dos células derivadas de mitosis donde ambas células hijas expresan fenotipo diferente al de la célula progenitora debido a un evento de recombinación genética cercana al centrómero .
Elaborada por Paola Argüello

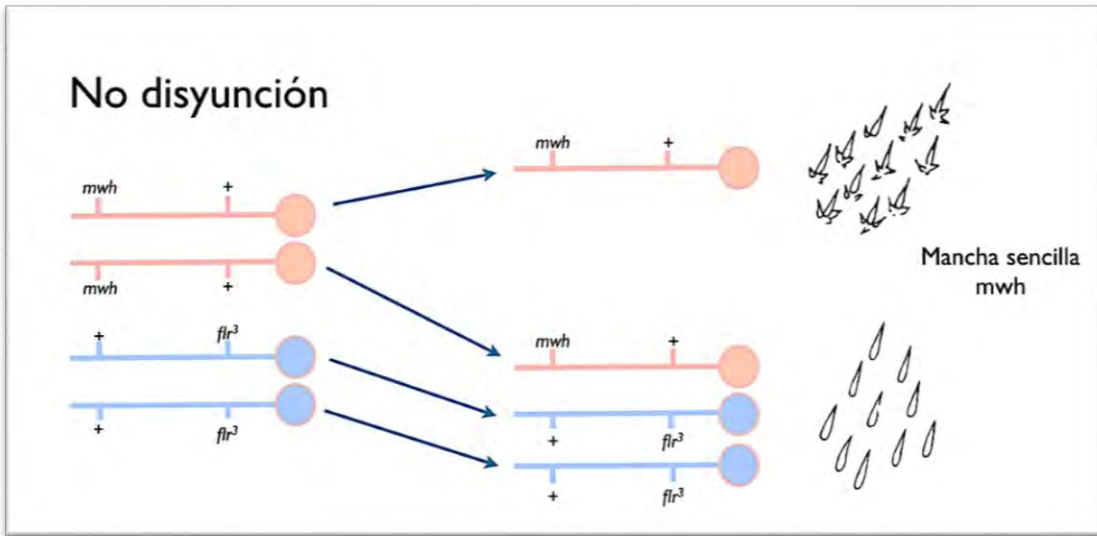


Figura 12. Diagrama representando dos células derivadas de mitosis; donde una expresa fenotipo diferente al de la célula progenitora (*mwh*) debido a un evento de no disyunción. Elaborada por Paola Argüello

III. JUSTIFICACIÓN.

El gordolobo (*G. conoideum* Kunth.) es una especie común, de fácil acceso y ampliamente usada en la medicina tradicional. Con esta planta se tratan diversos malestares, siendo la tos el más común. Sin embargo, se desconoce si posee un efecto genotóxico que aunado a su frecuente uso pudiese causar más daños que beneficios al consumidor.

IV OBJETIVOS.

IV.1 Objetivo general.

Determinar si la decocción de diversas concentraciones de *Gnaphalium conoideum* Kunth poseen un efecto genotóxico por medio del ensayo SMART en el ala de *Drosophila melanogaster*.

IV.2 Objetivos particulares.

1. Determinar la LC₅₀ de la decocción de *G. conoideum* en machos jóvenes *flr*³.
2. Estudiar el efecto genotóxico de la decocción a partir de las concentraciones determinadas por la LC₅₀.
3. Determinar si existe un efecto antigenotóxico de *G.conoideum*, cuando las moscas se exponen simultáneamente a un mutágeno y al extracto de la planta en estudio.

V HIPÓTESIS.

- 1) Si la decocción de *G. conoideum* Kunth posee un efecto genotóxico, entonces se obtendrá una frecuencia de manchas *mwh* y *flr*³ en larvas de 72±3h significativamente mayor a la obtenida en el control negativo.
- 2) Si la decocción de *G. conoideum* Kunth posee un efecto antígenotóxico, entonces se obtendrá una frecuencia de manchas *mwh* y *flr*³ en larvas de 72±3h significativamente menor a la obtenida en el control positivo.

VI MATERIALES Y MÉTODOS.

VI.1 Compuestos químicos empleados

El 4NQO (CAS 56-57-5) y Tween-80 (CAS 9005-65-6) se adquirieron en Sigma-Aldrich Química, S. RL de CV. Toluca de Lerdo, México.

Medio instantáneo Carolina.

Para el cultivo de las cepas de *D. melanogaster* usadas en este bioensayo se utilizó medio instantáneo Carolina^R (fórmula 4-24; Carolina Biological Supply, Burlington, NC, EUA).

VI.2 Obtención de la planta.

Se obtuvo la planta *G. conoideum* fresca y sin raíz en el Mercado de Sonora de la Ciudad de México, ubicado en Av. Fray Servando Teresa de Mier no.419, Col. Merced Balbuena, Delegación Venustiano Carranza.

VI.3 Preparación de la decocción

Se extendió la planta sobre camas de papel periódico para deshidratarla. Posteriormente, se trituró la planta con ayuda de un molino manual. Con la planta triturada se preparó la decocción, la cual consistió en 10g de planta y se mezcló con 100 mL de agua destilada. Las cantidades de planta y agua corresponden a una proporción 1:10. La mezcla se colocó en un vaso de precipitados y se dejó hervir durante 15 minutos. Finalmente, se filtró para obtener el concentrado de decocción.

VI.4 Prueba de CL50

La prueba de la concentración letal media (CL₅₀) se realizó para determinar las concentraciones con las que se trabajaría para evaluar el efecto genotóxico de la decocción de *G. conoideum* Kunth.

A partir del concentrado al 10% se realizaron diluciones para obtener las concentraciones a probar, siendo las que se presentan en la Tabla 2.

Tabla 1. Cantidades de agua y del concentrado obtenido empleadas para preparar las diferentes diluciones

Concentración (%)	Agua (mL)	Concentrado (mL)	Volumen final (mL)
0	1	0	10
2.5	7.5	2.5	10
5.0	5	5	10
7.5	2.5	7.5	10
10	0	10	10

De las concentraciones previamente mencionadas, se añadieron 2mL a 0.5g de medio instantáneo Carolina® en viales de 2.2 cm de diámetro por 9.5 cm de altura. Se realizaron cinco repeticiones por concentración, en cada vial se introdujeron 10 machos jóvenes *flr³* de 48±12h. Se registró la mortalidad de los individuos cada 24 h durante 3 días.

VI.5 Control positivo

Se utilizó 2 mM de 4NQO diluído en etanol, como control positivo en ambas cruzas. Se diluyó en etanol: por cada 0.0263g de 4NQO se añadieron 3mL de etanol para diluir el compuesto. El vaso de precipitados con la mezcla se colocó en el reostato a 100 rpm con un agitador magnético a 100°C. Una vez que el 4NQO se disolvió completamente, se añadió 1mL de Tween 80, la mezcla se mantuvo en el reostato en las condiciones antes mencionadas hasta que se evaporó completamente el etanol. La mezcla se llevó a un volumen de 70mL con agua destilada. Posteriormente se realizó el ensayo SMART con el procedimiento antes mencionado en ambas cruzas.

VI.6 Cotratamiento con 4NQO

El cotratamiento supone tratar con dos agentes distintos a los mismos individuos para ver la posible interacción de dichos agentes. En nuestro caso a las larvas de 72hrs (± 3 horas) se les adicionó al medio de cultivo simultáneamente 4NQO y la decocción. La concentración de 4NQO fue la usada en el control positivo (2mM) y la concentración más alta de decocción (10%). Para lograrlo, se trabajó con el 4NQO siguiendo el protocolo antes mencionado hasta evaporar por completo el etanol, en este punto se utilizó la decocción al 10%, para llevar la mezcla a un volumen final de 70mL.

VI.7 Ensayo SMART

En esta prueba se trabajó con individuos provenientes de dos tipos de cruza: 1) cruza estándar (ST) de hembras vírgenes *flr³/TM3* con machos *mwh/mwh*, 2) cruza de alta bioactivación (HB) de hembras vírgenes *ORR/ ORR; flr³/TM3* con machos *mwh/mwh*.

Las cruzas se realizaron con una proporción 1:2 de machos y hembras, respectivamente. Se transfirió la cruza a frascos de medio de cultivo adicionados con levadura fresca, durante 6h para que la progenie tuviera una diferencia de edad de ± 3 horas. Después de este tiempo se retiraron los adultos del medio, dejando en los frascos con medio únicamente a los huevos. Transcurridas 72 h, se extrajeron las larvas del medio utilizando una solución de sacarosa al 20% y una malla fina de nylon.

Para someter a las larvas a tratamiento, éstas se depositaron en viales conteniendo medio de cultivo Carolina hidratado con las diferentes concentraciones de decocción así como los controles positivos y negativos y la prueba de antimutagénesis. Al llegar a la etapa adulta se

separaron por fenotipo del ala y sexo, se almacenaron en etanol al 70%. Como control negativo, se utilizó agua destilada H₂O y como positivo, 2 mM de 4NQO.

Con las moscas trans-heterocigotas (con fenotipo silvestre en alas) se montaron preparaciones con las alas de 10 hembras y 10 machos por laminilla. Usando el microscopio estereoscópico se desprendió el par de alas de cada individuo y se adhirieron al portaobjetos con ayuda de la solución de Fauré. Se elaboraron 4 laminillas por tratamiento y los controles concurrentes.

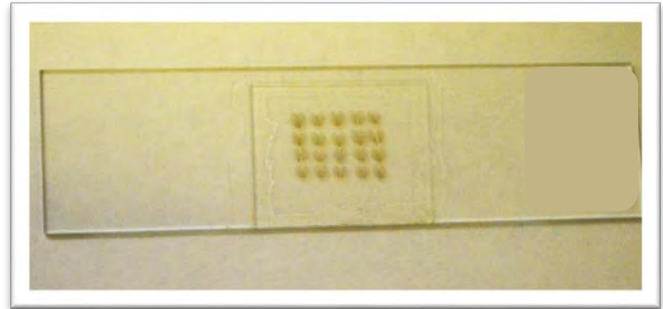


Figura 13. Laminilla de alas de *Drosophila melanogaster*.
Tomada por Paola Argüello

VI.8 Análisis de las muestras

Las laminillas se analizaron bajo microscopio óptico para registrar la frecuencia, el tipo, el tamaño y el número de manchas con los marcadores *mwh* y *flr*³. Se registraron los datos de 30 hembras y 30 machos por cada concentración.

Se analizaron las frecuencias de las lecturas por cada concentración, usando una prueba de X² una tabla de contingencia de 2 x 2 para comparar los datos entre cada lectura y verificar si los resultados entre ellas fuesen sumables o no. En caso de no serlo, se procedió a la lectura de una laminilla de la misma concentración. Los datos se analizaron con el programa SMART v2.0, el cual lleva a cabo un análisis estadístico. (Frei y Würgler, 1988 no publicado).

VII RESULTADOS.

VII.1 Prueba de letalidad (CL_{50})

Se llevó a cabo un experimento con cinco repeticiones independientes en machos jóvenes de la cepa *flr*³. En cada vial se contabilizaron 10 individuos, dando un total de 50 por cada tratamiento. En la Tabla 3 se muestra el número de organismos vivos registrados cada 24 h durante 3 días.

Tabla 2. Total de moscas vivas por concentración y tiempo de exposición.

Concentración de decocción (%)	0 h	24h	48h	72h	Porcentaje de mortalidad (%)
0	50	50	50	50	0
2.5	50	50	49	49	2
5	50	50	49	49	2
7.5	49	46	46	46	8
10	50	49	49	46	8

En la Tabla 2 se observa que el número de moscas vivas después de 72 h de exposición al xenobiótico no se aleja del control, siendo las dos concentraciones más altas aquellas en las que se presentó mayor número de moscas muertas; sin embargo este número equivale a un 8% de la población (como se muestra en la Tabla 3).

Los porcentajes resultantes en las concentraciones más altas que se pudieron obtener son el 8%, lo cual se encuentra muy alejado de la CL_{50} . Sin embargo se trabajó con estas concentraciones debido a que por medio de la decocción, no resulta posible alcanzar concentraciones más elevadas.

VII.2 Ensayo SMART.

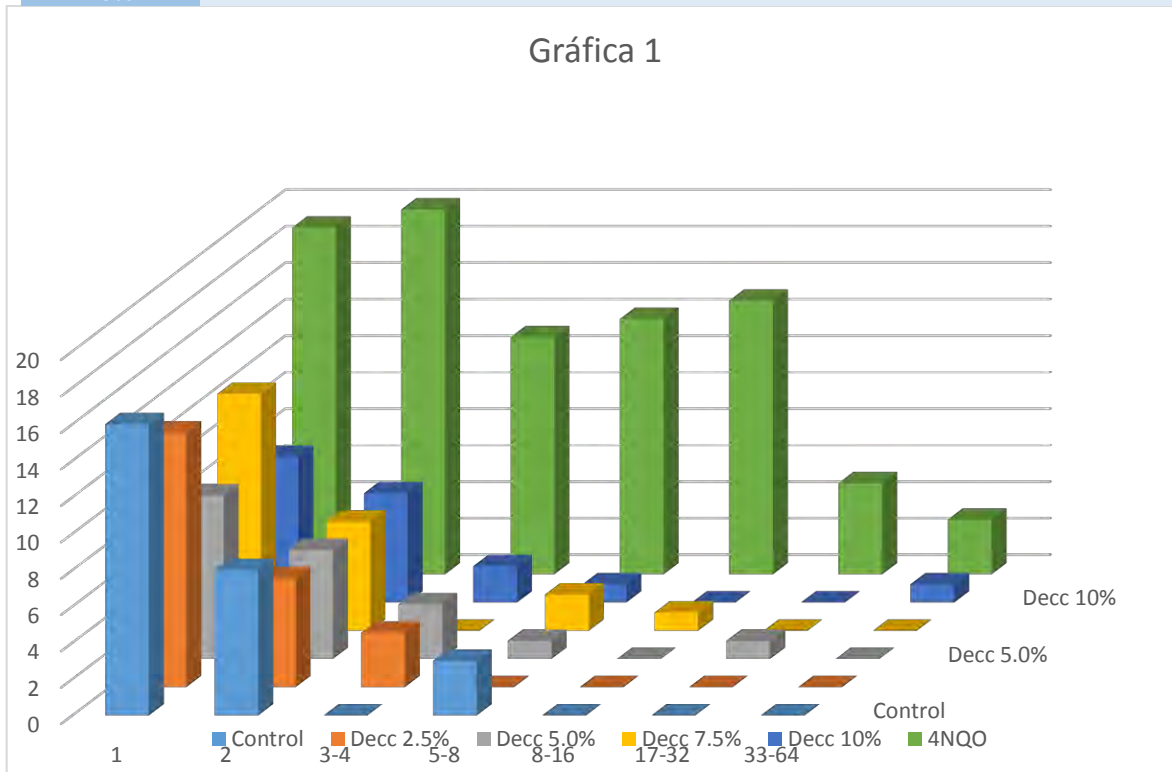
Cruza estándar (ST)

Los siguientes resultados provienen del ensayo SMART en ala en *D. melanogaster* en la craza estándar. Los individuos se trataron con diferentes concentraciones de decocción de *G. conoideum*, (0.0% 2.5%, 5%, 7.5% y 10%), con 4NQO 2 mM como control positivo, o con 4NQO 2 mM más decocción al 10%. En las tablas 3 y 4 se muestran los resultados obtenidos con el programa SMART elaborado por Frei y Würzler (1988). En estas Tablas se observa el número de manchas pequeñas, grandes y gemelas; así como las frecuencias de cada una.

En las Gráficas 1 y 2 se muestra el número de manchas *mwh* observadas en los diferentes tratamientos con base en el tamaño de la mancha. Se muestra la distribución de las machas que aparecen en cada concentración y tratamiento. Están agrupados en 7 categorías: 1, 2, 3-4, 5-8, 9-16, 17-32, 33-64. Es notoria la similitud entre el control negativo y las diferentes concentraciones utilizadas de la decocción de *G. conoideum*; sin embargo, la diferencia entre el control positivo (4NQO) dista notoriamente de las concentraciones de decocción que se usaron.

Tabla 3. Diagnóstico estadístico del experimento, decocción y control positivo y negativo. Cruza estándar.

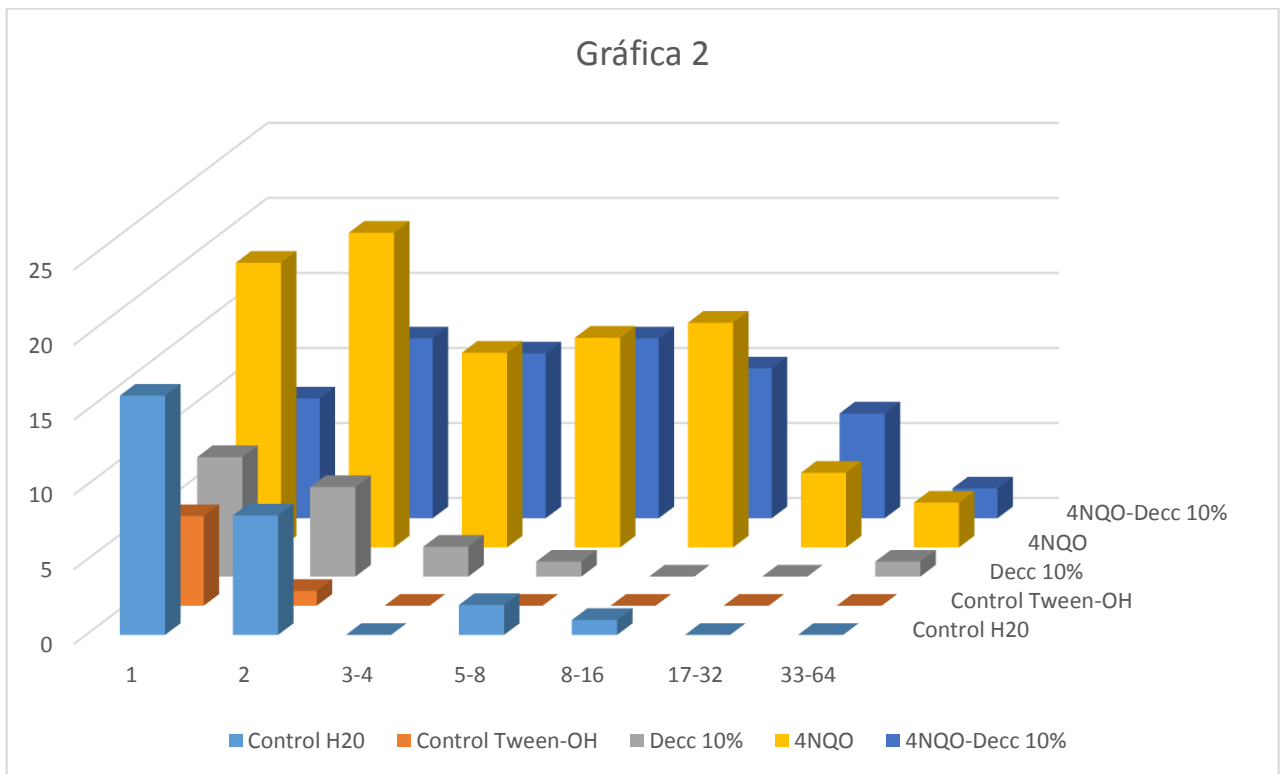
Concentración y testigos	No. de moscas	Manchas pequeñas m= 2.00	Manchas grandes m= 5.00	Manchas gemelas m= 5.00	Total de manchas m= 2.00	Manchas con clon mwh	Media por ciclo de división celular
Control H2O	60	0.40 (24)	0.05 (3)	0.02 (1)	0.047 (28)	27	1.67
Control 4NQO (2mM)	60	0.65 (39)+	0.78 (47)+	0.15 (9)+	1.58 (95)+	89	3.15
Decocción 2.5%	60	0.33 (20)-	0.05 (3)i	0.02 (1)i	0.040 (24)-	24	1.71
Decocción 5%	60	0.25 (15)-	0.08 (5)i	0.00 (0)i	0.33 (20)-	20	2
Decocción 7.5%	60	0.32 (19)-	0.05 (3)i	0.00 (0)i	0.37 (22)-	22	1.73
Decocción 10%	60	0.23 (14)-	0.05 (3)i	0.02 (1)i	0.30 (18)-	18	1.2



Gráfica 1. Gráfica de distribución por tamaño de manchas en los tratamientos y controles utilizados. Cruza estándar.

Tabla 4. Diagnóstico estadístico del experimento, decocción y control positivo, negativo y prueba de antimutagénesis. Cruza estándar.

Concentración y testigos	No. de moscas	Manchas pequeñas m= 2.00	Manchas grandes m= 5.00	Manchas gemelas m= 5.00	Total de manchas m= 2.00	Manchas con clon mwh	Media por ciclo de división celular
Control H ₂ O	60	0.40 (24)	0.05 (3)	0.02 (1)	0.047 (28)	27	1.67
Control Tween-OH	60	0.12 (7)-	0.00 (0)-	0.00 (0)i	0.12 (7) -	7	1.14
Decocción 10%	60	0.23 (14)-	0.05 (3)i	0.02 (1)i	0.30 (18)-	18	1.2
4NQO (2mM)	60	0.65 (39)+	0.78 (47)+	0.15 (9)+	1.58 (95)+	89	3.15
4NQO+ Decocción (2mM + 10%)	60	0.33(20)-	0.63(38)+	0.15 (9)+	1.12 (67)+	62	3.53



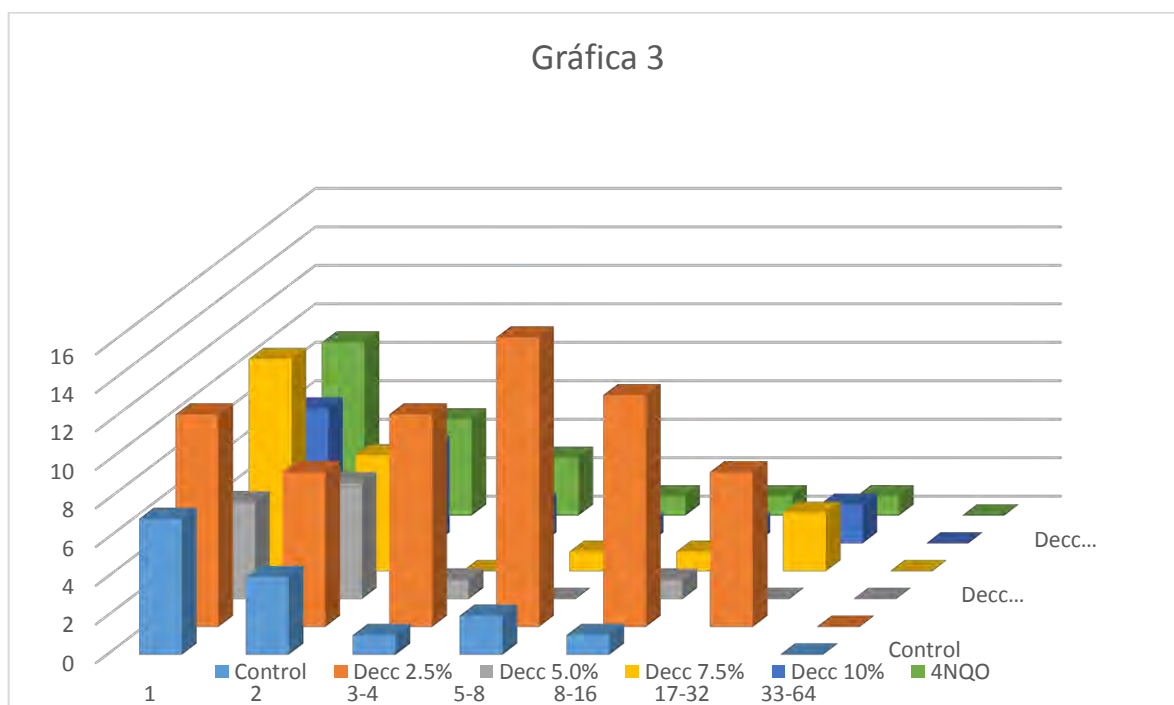
Gráfica 2. Gráfico de distribución por tamaño de manchas en los tratamientos y prueba de antimutágeno. Cruza estándar.

Cruza de Alta Bioactivación (HB)

En la Gráfica 3 se muestran los resultados del ensayo SMART en la cruce de alta bioactivación bajo las mismas condiciones y tratamientos que la cruce estándar. En las Tablas 5 y 6 se muestran el diagnóstico estadístico obtenido según el programa SMART de Frei y Würgler (1988). En la gráfica 5 y 6 se muestra la distribución de las machas que aparecen en cada concentración y tratamiento siguiendo las 7 categorías antes mencionadas.

Tabla 5. Diagnóstico estadístico del experimento, decocción y control positivo. Cruza de alta bioactivación.

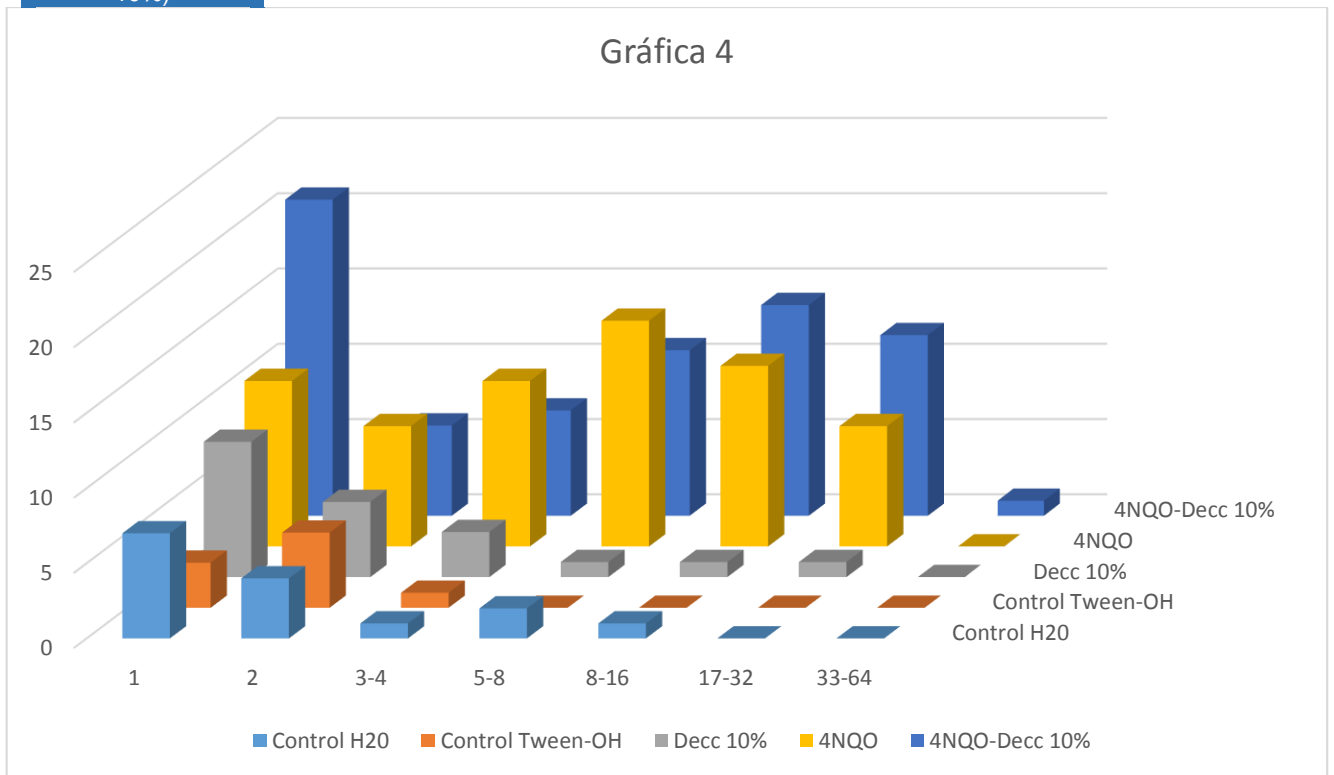
Concentración y testigos	No. de moscas	Manchas pequeñas m= 2.00	Manchas grandes m= 5.00	Manchas gemelas m= 5.00	Total de manchas m= 2.00	Manchas con clon mwh	Media por ciclo de división celular
Control H ₂ O	60	0.18 (11)	0.07 (4)	0.00 (0)	0.25 (15)	15	2.07
Control 4NQO (2mM)	60	0.32 (19)i	0.73 (44)+	0.15 (9)+	1.20 (72)+	65	3.51
Decocción 2.5%	60	0.18 (11)i	0.03 (2)-	0.00 (0)i	0.22 (13)-	13	1.92
Decocción 5%	60	0.28 (17)i	0.08 (5)-	0.00 (0)i	0.37 (22)i	22	2.27
Decocción 7.5%	60	0.20 (12)i	0.07 (4)-	0.03 (2)i	0.30 (18)i	18	2.44
Decocción 10%	60	0.23 (14)i	0.07 (4)-	0.03 (2)i	0.33 (20)i	20	2.15



Gráfica 3. Gráfico de distribución por tamaño de manchas en los tratamientos y controles utilizados. Cruza de alta bioactivación.

Tabla 6. Diagnóstico estadístico del experimento, controles y prueba de antimutágeno. Cruza de alta bioactivación.

Concentración y testigos	No. de moscas	Manchas pequeñas m= 2.00	Manchas grandes m= 5.00	Manchas gemelas m= 5.00	Total de manchas m= 2.00	Manchas con clon mwh	Media por ciclo de división celular
Control H2O	60	0.18 (11)	0.07 (4)	0.00 (0)	0.25 (15)	15	2.07
Control Tween-OH	60	0.13 (8)-	0.00 (0)-	0.02 (1)i	0.15 (9)-	9	1.78
Decocción 10%	60	0.23 (14)i	0.07 (4)-	0.03 (2)i	0.33 (20)i	20	2.15
4NQO (2mM)	60	0.32 (19)i	0.73 (44)+	0.15 (9)+	1.20 (72)+	65	3.51
4NQO+ Decocción (2mM + 10%)	60	0.43 (26)+	0.73 (44)+	0.20 (12)+	1.37 (82)+	72	3.43



Gráfica 4. Gráfico de distribución por tamaño de manchas en los tratamientos y cotratamiento de 4NQO y decocción. Cruza de alta bioactivación.

VIII. DISCUSIÓN

CL₅₀

Los valores obtenidos en la prueba de CL₅₀ mostraron que el gordolobo no tiene altos niveles de toxicidad, por lo que no fue imposible determinar el valor de la CL₅₀ y se decidió utilizar la concentración más alta que se pudo alcanzar sin saturar el medio acuoso, a partir de la cual se realizaron las diluciones al 7.5%, 5% y 2.5%.

SMART

Por tradición en México se continúan utilizando a las plantas por sus propiedades curativas y/o preventivas. Esta práctica es habitual en aproximadamente el 79% de la población mundial (Arencibia, *et al.*, 2003). En los Estados Unidos, por ejemplo, la mitad o más de las medicinas recetadas provienen de fuentes naturales, ya sea directa o indirectamente, ya que los compuestos naturales extraídos de las plantas sirven como modelo o como plantillas químicas para crear nuevos fármacos (Newman, *et al.*, 2008).

Gran parte de la bibliografía sobre el tema de las medicinas naturales tiende a enfocarse en la forma en que las plantas son fuente de medicinas tales como la quinina (para la malaria) y la pilocarpina (para el glaucoma), por mencionar algunas (Newman, *et al.*, 2008).

Estas medicinas provienen de un conjunto de compuestos químicos que los organismos generalmente desarrollan para protegerse de infecciones y otras enfermedades, algunos de estos agentes químicos han evolucionado, como los péptidos antimicrobianos presentes en una gran variedad de especies, cuya función es prevenir infecciones por bacterias, hongos y otros organismos (Newman, *et al.*, 2008). En el género *Gnaphalium* se han encontrado como producto de los metabolitos secundarios presentes diferentes propiedades antibióticas, antifúngicas, antioxidantes y expectorantes. En este género están presentes los flavonoides, los sesquiterpenos, los diterpenos, los triterpenos y los fitosteroles por mencionar algunos (Zheng *et al.*, 2013). Sin embargo, no existe una caracterización de los metabolitos presentes en la especie que se analiza en este bioensayo.

Nuestros resultados, por medio del ensayo SMART, indican que no hay diferencias significativas entre el control negativo y las diferentes concentraciones probadas de la decocción de *Gnaphalium conoideum* (hasta un 10%) tanto en la cruz estándar como en la de alta bioactivación de *D. melanogaster*.

En la Gráfica 1, se observa que sólo se encuentran manchas pequeñas en la cruz estándar. Si se comparan estas frecuencias con las encontradas en el control negativo, es de notarse que son muy similares entre sí. La aparición de estas manchas se debe a varios factores, uno de ellos es la existencia de errores propios de la mitosis. La aparición de manchas sencillas pequeñas (de 1 y 2 células) se encuentra también en la cruz de alta bioactivación. En esta categoría se encuentran las manchas obtenidas en los controles negativos: de agua y Tween-alcohol. Cabe notar que en las concentraciones 5%, 7.5% y 10% se encuentran también manchas grandes (de 17 a 32 células) lo cual indica que se produjeron en estado larval. La distribución del tamaño de mancha así como el número de las mismas, es similar entre los

controles negativos y las cuatro concentraciones de decocción usadas.

En este ensayo se realizó una exposición crónica a larvas de 72 ± 3 h de edad. Las larvas estuvieron en contacto y alimentándose del medio con los diferentes tratamientos por 48 h. Si se compara la frecuencia de manchas obtenidas en los tratamientos, así como en los controles negativos, no se encuentran diferencias estadísticamente significativas. Por lo tanto se puede decir que *G. conoideum* no presentó efectos genotóxicos mediante este bioensayo.

El 4NQO (4-Nitroquinolina 1-óxido) se utiliza como control positivo en varios ensayos de genotoxicidad, ya que se conocen sus propiedades mutagénicas y carcinogénicas (Brüsehauer *et al.* 2015). Además es uno de los compuestos carcinógenos más usados en investigación y afectar a varios órganos en mamíferos (Rivera, 2012). Como se esperaba, el 4NQO mostró un efecto positivo, (genotóxico) comparado con los controles negativos concurrentes. Esto nos habla de que el sistema está funcionando ya que este compuesto químico es capaz de inducir manchas de una forma significativa en las dos cruces (estándar y alta bioactivación). En este ensayo se utilizó el compuesto a una concentración de 2 mM, en otros ensayos como el reportado por Kaya *et al.*, en 2002, se utilizó este compuesto a una concentración más alta (3mM) los valores reportados por ese grupo de investigadores son similares a los encontrados en el presente estudio (Kaya *et al.*, 2002 reportó una frecuencia de manchas totales de 1.96, en este estudio la frecuencia fue de 1.58).

Existen reportes de experimentos realizados con plantas de interés medicinal, para evaluar su genotoxicidad o antigenotoxicidad en cotratamientos con algún genotóxico conocido. Con este fin se han realizado varios bioensayos, en la siguiente tabla se presentan ejemplos con SMART en el ala de *Drosophila melanogaster*. En la tabla se puede observar que los resultados reportados por los grupos de investigación mencionados son negativos al igual que en el presente bioensayo. Sin embargo encontraron un efecto genotóxico en varios de los ejemplos mencionados, el cual no se observa en el cotratamiento de la decocción de *G. conoideum* con el 4NQO.

Tabla 7. Ejemplos de estudios realizados para evaluar la genotoxicidad de plantas de uso en medicina tradicional empleando el ensayo SMART en ala de *Drosophila melanogaster*

PLANTA	TIPO DE EXTRACTO	CRUZA ESTÁNDAR	CRUZA DE ALTA BIOACTIVACIÓN	ANTIGENOTOXICIDAD	AUTORES	AÑO
<i>Helichrysum italicum</i>	Aceite esencial	No aplica	Negativo	Positivo a genotoxicidad Cotratamiento con Uretrano	Idaomar, Hamss, Bakkali, Mezzoug, Zhiri, Baudoux, Muñoz-Serrano, Liemans, Alonso-Moraga.	2001
<i>Ledum groenlandicum</i>	Aceite esencial	No aplica	Negativo	Positivo a genotoxicidad Cotratamiento con Uretrano	Idaomar, Hamss, Bakkali, Mezzoug, Zhiri, Baudoux, Muñoz-Serrano, Liemans, Alonso-Moraga.	2001
<i>Ravensara aromatica</i>	Aceite esencial	No aplica	Negativo	Positivo a genotoxicidad Cotratamiento con Uretrano	Idaomar, Hamss, Bakkali, Mezzoug, Zhiri, Baudoux, Muñoz-Serrano, Liemans, Alonso-Moraga.	2001
<i>Equisetum myriochaetum</i>	Acuoso y etanólico	Negativo	Negativo	Negativo a genotoxicidad	Ordaz-Tellez, Bárcenas-Rodríguez Quevedo-Olivares. Castañeda-Sortibrán Andrade-Cetto Rodríguez-Arnaiz	2006
<i>Brassica carinata</i>	Acuoso	Negativo	No aplica	Positivo a antigenotoxicidad Cotratamiento con peróxido de hidrógeno.	Lozano-Baena, Tasset, Obregón-Cano, Haro-Bailon, Muñoz-Serrano, Alonso-Moraga	2015
<i>Terminalia actinophylla</i>	Extracto etanólico	Negativo	Negativo	Cotratamiento con Mitomicina. Positivo a antigenotoxicidad	Pádua, P, Dihl, R, Abreu, B, Richter, M ANdrade, H.	2013
<i>Luehea divaricata</i>	Acuoso	Negativo	Negativo	Positivo a antigenotoxicidad. cotratamiento con Dexorubicina	Felicio L, Silva V, Ribeiro, Miranda, Vieira, Passos, Ferreira, Vale, Lima, Carvalho, Nunes	2011

Se han reportado actividades farmacológicas para los extractos de plantas del género *Gnaphalium* (Zheng, *et al.*, 2013). Una de ellas es la actividad antioxidante, por lo que se esperaría que tuviese un efecto antimutagénico al exponerse en cotratamiento con el 4NQO, ya que el mecanismo de acción de este carcinógeno es mediante estrés oxidativo. Sin embargo, los resultados indican que la decocción aunque disminuye la frecuencia de manchas en cotratamiento con el 4NQO, este decremento no es significativo.

Las diferencias que se encontraron con respecto a la frecuencia de manchas en ambas cruza se pueden deber parcialmente por los niveles basales de expresión de los citocromos P450 (CYP450) que se encuentra en mayor proporción en la cruza de alta bioactivación (Graf y van Schaik, 1992); sin embargo, a pesar de que estas diferencias no son significativas, es la principal diferencia entre las dos cruza. Los promutágenos muestran una genotoxicidad elevada cuando se exponen a la cruza de alta bioactivación (Graf y van Schaik, 1992). *Drosophila* tiene un amplio espectro de actividades metabólicas capaces de activar promutágenos y procarcinógenos (Graf *et al.*, 1984). Esto explica el incremento de manchas en la combinación del 4NQO y la decocción, en comparación a la exposición única del 4NQO cuando se utilizaron sobre la cruza de alta bioactivación.

Como se puede observar en la Gráfica 2, la frecuencia de manchas totales en la cruza estándar cuando se expone únicamente al 4NQO es de 1.58 mientras que de la cruza de alta bioactivación, que tiene un valor de 1.20 (Gráfica 4); estos valores se modifican cuando se realiza el cotratamiento con la decocción al 10%, donde la frecuencia de manchas totales es de 1.12 en la cruza estándar y en la cruza de alta bioactivación es de 1.37. Aunque esta última cifra es mayor al valor obtenido cuando se expone únicamente al 4NQO, en ambos casos las diferencias no son estadísticamente significativas.

El bioensayo SMART presenta varias ventajas, entre ellas que es un sistema *in vivo*; por lo que el metabolismo diferencial entre las cepas empleadas en este estudio permite evaluar si los agentes genotóxicos son de acción directa o indirecta. Los agentes de acción directa son detectados en la cruza estándar por que presenta niveles basales de CYP 450, ya que los agentes no necesitan metabolizarse por la fracción microsomal de la mosca en tanto que la cruza de alta bioactivación nos permite detectar promutágenos o genotóxicos de acción indirecta, pues presenta una sobreexpresión de estos citocromos

IX. CONCLUSIONES:

- Debido a que el porcentaje de mortalidad que se obtuvo en la prueba de la decocción de *Gnaphalium conoideum* Kunth no rebasa el 8%, no fue posible determinar la CL₅₀.
- La decocción de *G. conoideum* no mostró un efecto genotóxico sobre ambas cruas de *Drosophila*.
- EL control positivo funcionó exitosamente induciendo diferencias significativas respecto al control negativo, por lo que podemos aseverar que el bioensayo funciona adecuadamente.
- La decocción de *G. conoideum* no mostró tener un efecto como antimutágeno, ya que no hubo diferencias significativas entre la frecuencia y distribución de manchas entre el control positivo 4NQO y el cotratamiento con 4NQO y la concentración más alta de la decocción.

X. BIBLIOGRAFÍA

- Abolaji, A. O., Kamdem, J. P., Farombi, E. O., & Rocha, J. B. T. (2013). *Drosophila melanogaster* as a promising model organism in toxicological studies. *Arch. Bas. App. Med*, 1, 33-38.
- Arencibia Arrebola, D. F., Rosario Fernández, L., López Fera, Y., & Díaz Rivero, D. (2003). Las plantas, fuente de agentes antimutagénicos y quimiopreventivos. *Revista de Toxicología en línea*, 21, 37-51.
- Becher, P. G., Flick, G., Rozpędowska, E., Schmidt, A., Hagman, A., Lebreton, S., & Bengtsson, M. (2012). Yeast, not fruit volatiles mediate *Drosophila melanogaster* attraction, oviposition and development. *Functional Ecology*, 26(4), 822-828.
- Betancourt, I., Gutiérrez, M. y Betancourt, Y. (2000) Medicina herbolaria familiar : estudios de caso en 12 localidades comprendidas en las 5 regiones correspondientes a los 5 hospitales integrales con medicina tradicional de Ayotoxco, Guerrero, Cuetzlan del Progreso, Huehuetla, Coaxcatlán y Tulcingo del Valle. México: Secretaria de Salud, Plan Puebla Panamá.
- Brüsehafer, K., Manshian, B. B., Doherty, A. T., Zaïr, Z. M., Johnson, G. E., Doak, S. H., & Jenkins, G. J. (2015). The clastogenicity of 4NQO is cell-type dependent and linked to cytotoxicity, length of exposure and p53 proficiency. *Mutagenesis*, (31) 171–180.
- Castañeda-Sortibrán, A, Ordaz Téllez, M., & Rodríguez-Arnaiz, R. (2015). Assessment of the Genotoxic and Antioxidant Activities of Several Vegetables, Spices and Herbs in Combination with Cyclophosphamide and 4-Nitroquinoline n-Oxide in *Drosophila Melanogaster*. *Adv Tech Biol Med S*, 1, 2379-1764.
- Clark, A. M. (1982). The use of larval stages of *Drosophila* in screening for some naturally occurring mutagens. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 92(1), 89-97.
- Chivian, E., Bernstein, A., Rosenthal, J., (2008). Biodiversidad e investigación biomédica. En: *Preservar la vida, De cómo nuestra salud depende de la biodiversidad*. Eric Chivian, Aaron Bernstein (Eds). 269-270.
- Cuenca, P., & Ramírez, V. (2004). Aberraciones cromosómicas en trabajadoras expuestas a plaguicidas. *Revista de biología tropical*, 52(3), 623-628.
- Felício, L. P., Silva, E. M., Ribeiro, V., Miranda, C. T., Vieira, I. L. B. F., Passos, D. C. S., Nunes, W. B. (2011). Mutagenic potential and modulatory effects of the medicinal plant *Luehea divaricata* (Malvaceae) in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. SMART/wing. *Genetics and Molecular Research*, 10(1), 16-24
- García de Alba García, J, E., Ramírez, B, C., Robles, G., Zañudo, Julia., Rocha, S., García de Alba Verduzco, J. (2012). Conocimiento y uso de las plantas medicinales en la zona metropolitana de Guadalajara. *Desacatos* (39) 29-44.
- Gómez Álvarez, R., (2012). Plantas medicinales en una aldea del estado de Tabasco, México. *Fitotecnica Mexicana* 35 (1): 43 - 49.
- Graf, U. (1995). Analysis of the relationship between age of larvae at mutagen

- treatment and frequency and size of spots in the wing somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Experientia*, 51(2), 168-173.
- Graf, U., & van Schaik, N. (1992). Improved high bioactivation cross for the wing somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects*, 271(1), 59-67.
 - Graf, U., Abraham, S. K., Guzmán-Rincón, J., & Würgler, F. E. (1997). Antigenotoxicity studies in *Drosophila melanogaster*. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 402(1), 203-209.
 - Graf, U., Würgler, F. E., Katz, A. J., Frei, H., Juon, H., Hall, C. B., & Kale, P. G. (1984). Somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Environmental mutagenesis*, 6(2), 153-188.
 - Grawish, M. E., Zyada, M. M., & Zaher, A. R. (2011). Inhibition of 4-NQO-induced F433 rat tongue carcinogenesis by oleuropein-rich extract. *Medical Oncology*, 28(4), 1163-1168.
 - Hällström, I., Blanck, A., & Atuma, S. (1984). Genetic variation in cytochrome P-450 and xenobiotic metabolism in *Drosophila melanogaster*. *Biochemical pharmacology*, 33(1), 13-20.
 - Hällström, I., y Blanck, A. (1985). Genetic regulation of the cytochrome P-450 system in *Drosophila melanogaster*. I. Chromosomal determination of some cytochrome P-450-dependent reactions. *Chemico-biological interactions*, 56(2), 157-171.
 - Heres-Pulido, M. E., Dueñas-García, I., Castañeda-Partida, L., Sánchez-García, A., Contreras-Sousa, M., Durán-Díaz, Á., & Graf, U. (2004). Genotoxicity of tamoxifen citrate and 4-nitroquinoline-1-oxide in the wing spot test of *Drosophila melanogaster*. *Mutagenesis*, 19(3), 187-193.
 - Idaomar, M., El Hamss, R., Bakkali, F., Mezzoug, N., Zhiri, A., Baudoux, D., ... & Alonso-Moraga, A. (2002). Genotoxicity and antigenotoxicity of some essential oils evaluated by wing spot test of *Drosophila melanogaster*. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 513(1), 61-68.
 - Ikenaga, M., Ichikawa-Ryo, H., & Kondo, S. (1975). The major cause of inactivation and mutation by 4-nitroquinoline 1-oxide in *Escherichia coli*: Excisable 4NQO-purine adducts. *Journal of molecular biology*, 92(2), 341-356.
 - Imagen ciclo de vida drosophila: Weigmann K, Klapper R, Strasser T, Rickert C, Technau G, et al. (2003) FlyMove - a new way to look at development of *Drosophila*. *Trends Genet* 19: 310-311.
 - Instituto de Biología. "*Gnaphalium conoideum* Kunt. - UNIBIO: Colecciones Biológicas. 2011-06-14. Universidad Nacional Autónoma de México. Consultada en: 2014-3-2. Disponible en: <http://unibio.unam.mx/irekani/handle/123456789/14439?proyecto=Irekani>
 - Karekar, V., Joshi, S., & Shinde, S. L. (2000). Antimutagenic profile of three antioxidants in the Ames assay and the *Drosophila* wing spot test. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 468(2), 183-194.
 - Katz, A. J., & Foley, T. A. (1993). Effect of temperature on frequencies of spots in *Drosophila* wing-spot assay. *Environmental and molecular mutagenesis*, 22(1), 54-58.

- Kaya, B., Creus, A., Velázquez, A., Yanikoğlu, A., & Marcos, R. (2002). Genotoxicity is modulated by ascorbic acid: studies using the wing spot test in *Drosophila*. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 520(1), 93-101.
- Lozano-Baena, M. D., Tasset, I., Obregón-Cano, S., de Haro-Bailon, A., Muñoz-Serrano, A., & Alonso-Moraga, Á. (2015). Antigenotoxicity and Tumor Growing Inhibition by Leafy *Brassica carinata* and Sinigrin. *Molecules*, 20(9), 15748-15765.
- Martínez, C. A. R., & RIVERA, M. (2012). 4NQO carcinogenesis: A model of oral squamous cell carcinoma. *Int. J. Morphol*, 30(1), 309-314.
- Newman, D., Kilama, J., Bernstein, A., Chivian, E. (2008). *Medicinas en la naturaleza*. En: *Preservar la vida, De cómo nuestra salud depende de la biodiversidad*. Eric Chivian, Aaron Bernstein (Eds). 181-187.
- Nunoshiba, T., & Demple, B. (1993). Potent intracellular oxidative stress exerted by the carcinogen 4-nitroquinoline-N-oxide. *Cancer Research*, 53(14), 3250-3252.
- Pádua, P. F. M. R., Dihl, R. R., Lehmann, M., de Abreu, B. R. R., Richter, M. F., & de Andrade, H. H. R. (2013). Genotoxic, antigenotoxic and phytochemical assessment of *Terminalia actinophylla* ethanolic extract. *Food and chemical toxicology*, 62, 521-527.
- Pandey, U. B. B. y Nichols C. D. (2011). Human disease models in *Drosophila melanogaster* and the role of the fly in therapeutic drug discovery. *Pharmacological reviews* 63 (2): 411-436.
- Pérez-Urria Carril, E., & Ávalos García, A. (2009). Metabolismo secundario de plantas. *REDUCA*, 2(3), 119-145.
- Prokop, A. (2013). *A rough guide to Drosophila mating schemes*, en *How to Design a Genetic Mating Scheme: A Basic Training Package for Drosophila Genetics*, (2013) *G3, Genes/Genomes/Genetics* (3) 353-358. Disponible en: <http://halfonlab.ccr.buffalo.edu/courses/BCH512/Roote+Prokop-SupplMat-1v2.2.pdf>
- Ransom, R. (1982). *A handbook of Drosophila development*. Elsevier Biomedical Press.
- Rodríguez-Arnaiz (1994) Las toxinas ambientales y sus efectos genéticos. México: Fondo de Cultura Económica. ISBN: 968-16-6880-4
- Rodrigues de Andrade, H. H., Reguly, M. L., & Lehmann, M. (2004). Wing somatic mutation and recombination test. *Drosophila Cytogenetics Protocols*, 389-412.
- Royal Society of Chemistry. "LD50" [Lethal Dose 50%] (En línea). Fecha de consulta: 2 de abril 2014. Disponible en: [<http://www.rsc.org/pdf/ehsc/ld50.pdf>]
- Sepel, L. y Loreto, E. (2010). Um século de *Drosophila* na genética, *Sociedade Brasileira de Genética*. 5 (02): 42-47
- Sepúlveda, J., Porta, D., Rocha, S., (2003), La participación de los metabolitos secundarios en la depredación de las plantas. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 21 (3): 355-363.
- Silbergeld K, (1998) *Toxicología. Enciclopedia de salud y seguridad en el trabajo pp. 33.2-33.4. Gestión editorial Chantal Dufresne, BA.*
- Sortibrán, A. N. C., Téllez, M. G. O., & Arnaiz, R. R. (2015). Assessment of the Genotoxic and Antioxidant Activities of Several Vegetables, Spices and Herbs in

Combination with Cyclophosphamide and 4-Nitroquinoline n-Oxide in *Drosophila Melanogaster*. *Adv Tech Biol Med S*, 1, 2379-1764.

- Tada, M., & Tada, M. (1971). Interaction of a carcinogen, 4-nitroquinoline-1-oxide, with nucleic acids: chemical degradation of the adducts. *Chemico-biological interactions*, 3(3), 225-229.
- Taddei-Bringas, A. y A. Santillana-Macedo. (1999). Aceptación y uso de la herbolaria en la medicina familiar, *Salud pública de México* 41 (3):216-220
- Téllez, M. G. O., Rodríguez, H. B., Olivares, G. Q., Sortibrán, A. N. C., Cetto, A. 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(1), 182-189.
- The Scientist (s.f) *Instant Messaging During development, communication between organs determines their relative final size*. Recuperado el 19 de mayo 2016. Disponible en: <http://www.the-scientist.com/?articles.view/articleNo/34435/title/Instant-Messaging/>
- UNAM, Atlas de la Medicina Tradicional Mexicana [en línea]. México, 2009 [Fecha de consulta: 2 Marzo 2014] Gordolobo, *Gnaphalium oxyphyllum*. Disponible en <<http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/monografia.php?l=3&t=&id=7550>>
- Vettorazzi, G., & Ginebra, S. (1992). Ensayos necesarios para la valoración toxicológica de las sustancias químicas. *Programa Internacional de Seguridad de las Sustancias Químicas y Organización Mundial de la Salud. Suiza*, 67-75.
- Vogel, E. W. (1992). Tests for recombinagens in somatic cells of *Drosophila*. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 284(1), 159-175.
- Weigmann, K., Klapper, R., Strasser, T., Rickert, C., Technau, G., Jäckle, H., Janning, W., Klämbt, C: FlyMove- a new way to look at development of *Drosophila*. *Trends Genet* (2003) 19, 310.
- Zheng, X., Wang, W., Piao, H., Xu, W., Shi, H., Zhao, C., (2013) The Genus *Gnaphalium* L. (Compositae): Phytochemical and Pharmacological Characteristics. *Molecules* (18): 8298-8318.