UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

Evaluación de la genotoxicidad de la semilla del toloache (*Datura stramonium* L.) por medio del Ensayo de Mutación y Recombinación Somática (SMART) en alas de *Drosophila melanogaster*

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A:

Daniela Núñez Ledezma

DIRECTORA DE TESIS:
Dra. América Nitxin Castañeda Sortibrán

Ciudad Universitaria, CD. MX., 2021

Universidad Nacional Autónoma de México
UNAM
Biblioteca Central
Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

1. Datos del alumno
Núñez
Ledezma
Daniela
55 6186 6365
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología
312157443

2. Datos del tutor
Dra.
América Nitxin
Castañeda
Sortibrán

3. Datos del sinodal 1
Dr.
Juan Servando
Núñez
Farfán

4. Datos del sinodal 2
Dr.
Javier Andrés
Juárez
Díaz

5. Datos del sinodal 3
M. en C.
Liliana
Sánchez
Estrada

6. Datos del sinodal 4
Dra.
Rosario
Rodríguez
Arnaiz

7. Datos del trabajo escrito
Evaluación de la genotoxicidad de la semilla de toloache (*Datura stramonium* L.) por medio del Ensayo de Mutación y Recombinación Somática (SMART) en alas de *Drosophila melanogaster*
42 p
2021

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Rosario Rodríguez Arnaiz por la oportunidad de conocer la Toxicología Genética y el privilegio de trabajar en su laboratorio, realmente aprecio lo que me enseñó; me hizo recordar lo mucho que me gusta la Genética.

A mi asesora de tesis, la Dra. América N. Castañeda Sortibrán, por la guía, asesoría y paciencia que me brindó en la realización de este trabajo, además de permitirme hacer mi servicio social y colaborar en otros proyectos con ella, siempre valoraré esa experiencia y convivencia.

A la M. en C. María Guadalupe Ordaz Téllez, al Dr. Héctor G. Vázquez López, a Lucero y a mis compañeras Diana y Michelle por su compañía y apoyo en el laboratorio, en especial por ayudarme con algunas laminillas y con el mantenimiento de las moscas durante el experimento.

A la Biól. Claudia M. Flores Loyola y al M. en C. Ricardo I. Peraza Vega por todo lo que me enseñaron, tanto a nivel teórico como práctico, para llevar a cabo este trabajo.

Al Dr. Juan S. Núñez Farfán, del Laboratorio de Genética Ecológica y Evolución del Instituto de Ecología (UNAM), por proporcionar las semillas para desarrollar mi tesis.

Por último, a mi familia y amigos por el tiempo que han pasado conmigo, el simple hecho de su existencia y los lazos que compartimos me inspira a seguir adelante.

CONTENIDO

Resumen 1

I. Introducción 2

El toloache y su uso en la medicina tradicional mexicana 2

Características de la planta 3

Toxicología de D. stramonium 5

La mosca de la fruta como modelo biológico 7

Ciclo de vida de D. melanogaster 8

Ensayo de Mutación y Recombinación Somática (SMART) 9

Clasificación de las manchas 10

Mecanismos de formación de manchas 11

II. Objetivos 14

Objetivo general 14

Objetivos particulares 14

III. Hipótesis 14

IV. Material y métodos 15

Compuestos químicos 15

Obtención de las semillas 15

Preparación del extracto de semillas 15

Determinación de la concentración letal media (CL_{50}) 15

Grupo testigo 16

Control positivo 16

Control negativo 17

Prueba de antigenotoxicidad 17

Ensayo SMART 17

Cruzas y sincronización 17

Tratamiento de las larvas 18

Montado de las alas 18

Análisis de las muestras 19

V. Resultados 20
Determinación de la CL_{50} 20
Ensayo SMART 21
Genotoxicidad 21
Antigenotoxicidad 23
VI. Discusión 25
Concentración letal media (CL_{50}) 25
Genotoxicidad 25
Antigenotoxicidad 28
VII. Conclusiones 30
VIII. Referencias bibliográficas 31

Resumen

Datura stramonium L., vulgarmente conocida como toloache, es una de las plantas más utilizadas dentro de la medicina tradicional mexicana. En México, se comercializa comúnmente por sus conocidos efectos analgésicos para tratar dolores crónicos y agudos. Esta hierba, al igual que muchas otras especies de la familia Solanaceae, se caracteriza por su contenido de alcaloides tropánicos que son los responsables de las propiedades narcóticas, alucinógenas y tóxicas de la planta.

En este estudio se evaluó el potencial genotóxico de las semillas de *D. stramonium*, que son la parte del vegetal que presenta la mayor concentración de alcaloides tropánicos, por medio del Ensayo de Mutación y Recombinación Somática (SMART) en células de las alas de la mosca de la fruta (*Drosophila melanogaster*) que tiene como fundamento detectar la pérdida de la heterocigosis utilizando marcadores recesivos que se expresan al nivel de los tricomas en la superficie de las alas de las moscas. Este bioensayo usa generalmente las cruzas estándar (ST) y de alta bioactivación (HB), la segunda se aplica para la detección de promutágenos y procancerígenos. Para este estudio, se empleó una decocción de semillas en cuatro diferentes concentraciones (3, 6, 12 y 24%) para detectar un posible efecto genotóxico. Además, para determinar la existencia de un posible efecto antigenotóxico, se realizó un cotratamiento con la decocción de semillas al 24% y un compuesto mutagénico (4NQO).

Los resultados permitieron concluir que la decocción de semillas de *D. stramonium* presenta un efecto genotóxico y no es antigenotóxica en ambas cruzas. Asimismo, se determinó que no se requiere de una activación metabólica para mostrar su genotoxicidad.

I. Introducción

El toloache y su uso en la medicina tradicional mexicana

La medicina tradicional, o el saber médico popular (Menéndez, 1994), se refiere al conocimiento del uso de plantas medicinales provenientes de la región para prácticas médicas. Ésta tiene un amplio uso en México, tanto en el sector rural-indígena como en el urbano-mestizo, y se ha transmitido por muchas generaciones como herencia cultural. Además, ha sido aceptada y utilizada en una Unidad de Medicina Familiar (UMF) del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) en Hermosillo, Sonora (Taddei-Bringas *et al.*, 1999). Este tipo de medicina, de acuerdo con Nigenda *et al*. (2001), "representa una opción importante de respuesta ante las necesidades de atención a la salud en diferentes países de América Latina y el Caribe, esta participación ha sido reconocida por la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Organización Panamericana de la Salud (OPS)".

Dentro de la lista de herbolaria empleada en la medicina tradicional mexicana está la planta conocida como 'Toloache', del náhuatl *toloatzin* ("inclinar la cabeza por el efecto del sueño"), que es el principal nombre utilizado para referirse a la especie *Datura inoxia* M. y se usa de manera secundaria para *Datura stramonium* L., aunque también puede aplicarse a otras especies del mismo género (Aguilar *et al.*, 1994; Figueroa-Morales, 2008).

D. stramonium está entre las plantas comúnmente comercializadas en nuestro país y su área de uso abarca los estados de Veracruz, Tlaxcala, Tabasco, Sonora, Sinaloa, Quintana Roo, Puebla, Oaxaca, Nayarit, Morelos, Michoacán, Hidalgo, Guerrero, Guanajuato, Estado de México y Ciudad de México (Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana, 2009). Debido a sus efectos analgésicos ante dolores crónicos y agudos (Khalili y Atyabi, 2004), esta planta es utilizada para aliviar dolores dentales, musculares, reumáticos, menstruales, de parto y cefaleas; también se emplea para tratar tos, asma, tosferina, resfriado, paperas, helmintiasis, úlceras, hemorroides, infecciones vaginales, comedones, tumores superficiales, heridas, quemaduras, erisipelas, neuralgia, gota, espolones óseos, diferentes tipos de inflamaciones y para remover ectoparásitos (Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana, 2009; Benítez *et al.*, 2018; Silva-Ramos *et al.*, 2018). Para el tratamiento de estas afecciones, esta planta (hojas, flores, raíz o semillas) se administra por medio de infusión, decocción, cigarrillos, ingestión directa con o sin agua, baño, cataplasma, emplasto, ungüento, macerada en agua o alcohol, tinturas, por aplicación directa (intacta, soasada o cocida) y untada con aceite,

mantequilla o Vick® Vaporub®, según sea el caso (Morton, 1981; Alcorn, 1984; Aguilar *et al*. 1994; Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana, 2009).

Características de la planta

La especie *D. stramonium* (Figura 1) es una hierba robusta de ciclo anual y de crecimiento rápido que puede medir de 30 cm a 1 m de altura y tiene un olor fétido; presenta un solo tallo con pocas ramas, hojas redondeadas y con borde recortado, flores solitarias blancas o violáceas, frutos (Figuras 2 y 3) en forma de cápsulas ovoides con numerosas espinas fuertes y con una gran cantidad de semillas marrones a negras en su interior (Rzedowski y Rzedowski, 2001; Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana, 2009).

- Reino: Plantae
- *Phylum*: Magnoliophyta
- Clase: Magnoliopsida
- Orden: Solanales
- Familia: Solanaceae
- Género: *Datura*
- Especie: *Datura stramonium* Linneo

Fotografía por Kurzenko (s.f.), 123RF.

Figura 1. Clasificación taxonómica del toloache (UNIBIO: Colecciones biológicas, 2007).

Figura 2. Frutos inmaduro (izquierda) y maduro (derecha) de *D. stramonium.*
Fotografía por Zocchi (s.f.), 123RF.

Figura 3. Frutos maduros y semillas de *D. stramonium.*
Fotografía por Vainillaychile (s.f.), 123RF.

Esta planta, probablemente nativa de México, está ampliamente distribuida en las regiones templadas y tropicales del mundo (Mondragón-Pichardo, 2009); es muy común encontrarla en áreas rurales (herbazales ruderales como bordes de los caminos, escombreras, huertos sin cultivar, tierras cultivadas, entre otros), pero también crece en jardines públicos y en los solares urbanos no edificados o descuidados (Soler-Rodríguez *et al.*, 2012). Como se ilustra en la Figura 4, en México se ha registrado la presencia de esta planta en la mayoría de los estados (Villaseñor-Ríos y Espinosa-García, 1998), además, es una de las especies del género *Datura* con mayor distribución en el país (Luna-Cavazos y Bye, 2011).

Figura 4. Distribución geográfica de *D. stramonium* en México. Mapa generado con base en la información de Villaseñor-Ríos y Espinosa-García (1998).

Toxicología de D. stramonium

Las plantas del género *Datura*, al igual que muchas otras solanáceas, presentan propiedades narcóticas, alucinógenas y tóxicas debido a su contenido de alcaloides tropánicos (Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana, 2009). La especie *D. stramonium* tiene alrededor de 67 alcaloides tropánicos (El Bazaoui *et al.*, 2011), los cuales varían en cantidad de acuerdo a la constitución genética de la planta, el estadio del ciclo de vida, el órgano y el lugar y temporada donde se obtuvo (Elzenga, 1957; Miraldi *et al*., 2001; Berkov y Philipov, 2002; Castillo *et al*., 2013; Castillo *et al*., 2019; Moreno-Pedraza *et al*., 2019).

Los alcaloides más abundantes en *D. stramonium* son la atropina (o *dl*-hiosciamina) y la escopolamina (o *l*-hioscina) y se encuentran en casi todos los órganos de la planta (Eger, 1962; Witte *et al.*, 1987; Miraldi *et al*., 2001; El Bazaoui *et al.*, 2009; Marín-Sáez *et al*., 2016), además, son los responsables de la toxicidad anticolinérgica de la planta debido a sus propiedades

antimuscarínicas (Rumack, 1973; Broadley y Kelly, 2001; Akinmoladun *et al*., 2014), es decir, son agentes que inhiben la actividad de los receptores muscarínicos del sistema nervioso, afectando principalmente al músculo cardíaco, el músculo liso y las glándulas exocrinas (Rumack, 1973; Bruneton, 2001; Brunton *et al*., 2011). Las semillas de *D. stramonium* son la parte de la planta que presenta la mayor concentración de estos alcaloides (Miraldi *et al*., 2001), obtienen un rango de 0.17 a 2.71 mg/g para la atropina y 0.12 a 0.69 mg/g para la escopolamina (Friedman y Levin, 1989; Miraldi *et al*., 2001).

La administración de cualquier órgano de esta planta por vía oral, inhalada o tópica en membranas mucosas puede provocar síndrome anticolinérgico, esto se debe a que los alcaloides son mejor absorbidos por estas vías en comparación con la vía tópica cutánea (Tønnesen, 1948; Tonndorf *et al*., 1953; Gaire y Subedi, 2013; Benítez *et al.*, 2018), y el tiempo que tardan en aparecer los síntomas varía de 5 a 60 min dependiendo de la dosis y la vía de administración, además de que los síntomas pueden perdurar por días (Diker *et al*., 2007; Günaydin *et al.*, 2017). La intoxicación por *D. stramonium* provoca manifestaciones clínicas en el ser humano como: ansiedad, alucinaciones, delirio, hiperactividad, irritabilidad, desorientación, habla incomprensible, amnesia, convulsiones, visión borrosa, midriasis, enrojecimiento, sequedad en las membranas mucosas, hipertermia, taquipnea, taquicardia, hipertensión, disminución de la motilidad intestinal, retención urinaria, estado de coma y muerte, dependiendo de la severidad del envenenamiento (Rumack, 1973; Urich *et al*., 1982; Centers for Disease Control and Prevention, 1995; Diker *et al*., 2007; Sever y Cekin, 2007; Spina y Taddei, 2007); cabe mencionar que los casos más graves que se han reportado fueron a causa de la ingesta de las semillas, ya sea masticadas o preparadas en té (Nehaul, 1955; Urich *et al*., 1982; Boumba *et al*., 2004; Diker *et al*., 2007). Dentro de los casos de intoxicación con *D. stramonium*, muchas veces se desconoce con exactitud la dosis o concentración administrada (Boumba *et al*., 2004; Diker *et al*., 2007; Sever y Cekin, 2007; Stella *et al*., 2010; Günaydin *et al.*, 2017) y, aunque se han registrado muertes a partir de la ingesta de 125 semillas (Nehaul, 1955), también hay casos donde han sobrevivido con la ingesta de hasta 300 semillas (Spina y Taddei, 2007), por lo que la dosis letal de esta planta en humanos es incierta.

Se ha reportado que las semillas de *D. stramonium* son genotóxicas, citotóxicas y apoptóticas en cultivos de linfocitos humanos (Steenkamp *et al*., 2005; Akal *et al*., 2014), en cambio, su genotoxicidad es insignificante o ausente en la bacteria *Salmonella typhimurium*

(Friedman y Henika, 1991; Reid *et al.*, 2006; Verschaeve y Van Staden, 2008), aunque las hojas y raíces de la planta si presentan un efecto mutagénico en dicho microorganismo (Verschaeve y Van Staden, 2008). Por otro lado, sus componentes principales (atropina y escopolamina) no son genotóxicos en *S. typhimurium* (Glatt *et al*., 1983; McCann *et al*., 1975; Nakamura *et al*., 1987), no obstante, sí lo son en células humanas: la escopolamina en linfocitos humanos (Yu *et al*., 1988) y la atropina en células de hepatoma humano HepG2 (Svobodova *et al*., 2011).

Dada la importancia de ésta y otras plantas dentro de la medicina tradicional y como recurso para el desarrollo de medicamentos, es fundamental conocer sus efectos tóxicos y genotóxicos para que la decisión sobre su uso sea la más adecuada. En la mayoría de los casos, la toxicidad de estas plantas no se ha investigado por completo, pudiendo ser en extremo perjudiciales para la salud (Ocegueda *et al*., 2005). Por esta razón, es importante evaluar el potencial genotóxico de estas plantas y para ello se realizan ensayos de genotoxicidad, pruebas diseñadas para detectar si existe un efecto genotóxico por parte de la planta a ensayar. Estos ensayos utilizan diferentes modelos biológicos y metodologías que pueden dirigir a diferentes resultados, por lo que es ventajoso realizar más de una prueba con la misma especie de planta, de esta forma se puede obtener un panorama más amplio de la genotoxicidad, y en algunos casos de la antigenotoxicidad, de la planta ensayada o parte de ella. Entre las especies y tipos celulares más utilizados como modelos biológicos en estas pruebas están: bacteria *S. typhimurium*, cebolla (*Allium cepa*), caracol común (*Helix aspersa*), artemia (*Artemia* sp.), mosca de la fruta (*Drosophila melanogaster*), pez cabeza de serpiente manchado (*Channa punctatus*), células de ovario de hámster chino (CHO) y ratones Swiss (Sponchiado *et al*., 2016).

La mosca de la fruta como modelo biológico

La llamada mosca de la fruta o del vinagre (*Drosophila melanogaster*) es un díptero de la familia Drosophilidae que se emplea como organismo experimental para el estudio de los mecanismos de la herencia desde los comienzos de la genética como ciencia a principios del siglo XX y sus campos afines (Ramírez-Santos y Gómez-Eichelmann, 2003). Este insecto se usa como modelo biológico para estudios de toxicología y enfermedades humanas debido a que presenta similitudes en los procesos moleculares involucrados en la esperanza de vida y el envejecimiento del ser humano, existe un buen grado de homología genética (60%) entre las dos especies, alrededor del 75% de los genes asociados a enfermedades humanas tienen

homólogos en *D. melanogaster* (Abolaji *et al.*, 2013; Ugur *et al*., 2016); además de que, en comparación con otros modelos, *D. melanogaster* ofrece un tiempo generacional corto, facilidad de uso, mantenimiento en el laboratorio en poblaciones numerosas a causa de su escaso tamaño y vida corta, presenta pocas preocupaciones éticas y su genoma puede manipularse fácilmente (Abolaji *et al.*, 2013). Por estas razones, *D. melanogaster* se ha convertido en un modelo adecuado para predecir el potencial tóxico de un gran número de agentes químicos, físicos y biológicos.

Ciclo de vida de D. melanogaster

D. melanogaster es un organismo holometábolo, es decir, es un insecto que presenta una metamorfosis completa (embrión, larva, pupa y adulto) y su ciclo de vida (Figura 5) dura aproximadamente 10 días a una temperatura de 25 °C. Las hembras fecundadas pueden almacenar el esperma en el receptáculo seminal para la fecundación de cientos de huevos durante varios días. El desarrollo embrionario del huevo dura alrededor de 21 h, la larva que eclosiona del huevo pasa por tres estadios larvarios (los dos primeros duran 24 h cada uno y 2 días el tercero) y posteriormente, forma la pupa. Durante el estadio de pupa ocurre la metamorfosis y hasta el décimo día, después de la oviposición, emerge el adulto, el cual requiere de 8 h para madurar sexualmente (Demerec, 1950).

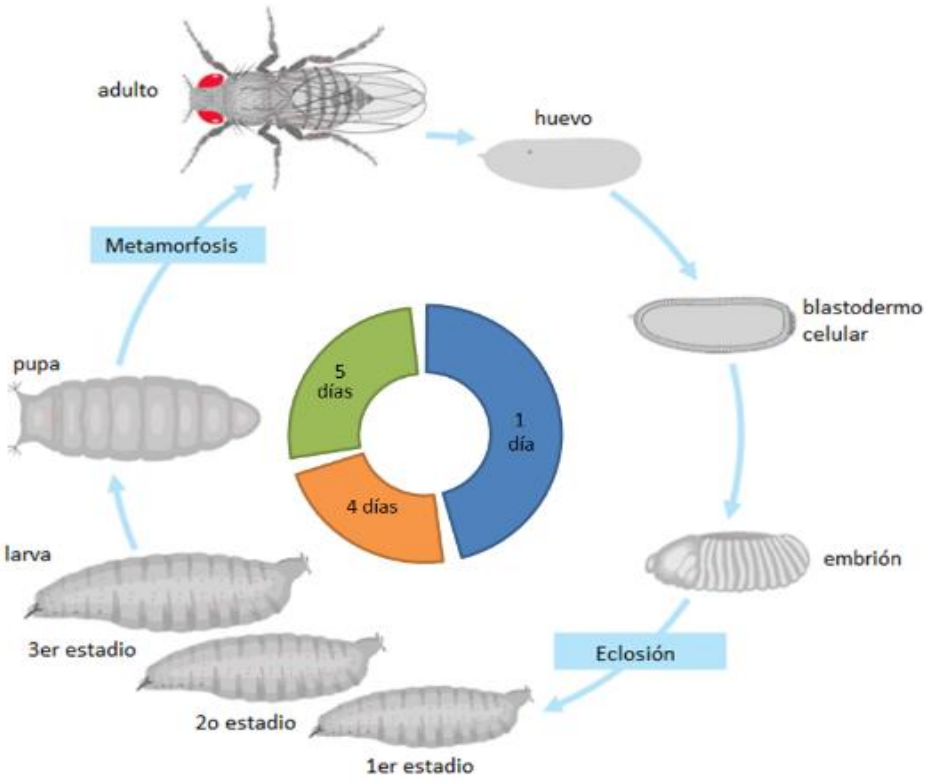


Figura 5. Ciclo de vida de *D. melanogaster*. Modificado de Morgan (2007).

Ensayo de Mutación y Recombinación Somática (SMART)

El Ensayo de Mutación y Recombinación Somática (SMART, por sus siglas en inglés) es una prueba creada por Graf *et al.* (1984) que se utiliza para detectar la actividad mutagénica y recombinogénica inducida por diversos compuestos químicos potencialmente genotóxicos. Este bioensayo consiste en el uso de los marcadores "*multiple wing hairs*" (*mwh*) y "*flare*" (*flr*^{3}) de larvas trans-heterocigóticas (*mwh* + / + *flr*^{3}) de tercer estadio (72 h) de *D. melanogaster*, las cuales se exponen al compuesto a estudiar de manera crónica o aguda con el objeto de determinar si dicho compuesto es capaz de producir alteraciones en el genotipo del drosofílido, las cuales se detectan por la pérdida de heterocigosis y la presencia de clones o "manchas" que muestran los fenotipos de los marcadores *mwh* ("pelos múltiples del ala") y *flr*^{3} ("flama") que se expresan al nivel de los tricomas de la superficie de las alas del insecto adulto (Graf *et al.*, 1984). El marcador *mwh* es una mutación recesiva, ubicada en el cromosoma 3 en la posición 0.3, que se expresa con la presencia de más de un tricoma (generalmente tres) por célula, mientras que el marcador *flr*^{3} es una mutación letal recesiva, ubicada en el cromosoma 3 en la posición 38.8, que se caracteriza por la formación de tricomas en forma de flama y es letal en condición homocigota (Lindsley y Zimm, 1992). Debido a la condición letal del marcador *flr*^{3}, se emplea un cromosoma balanceador, el cual contiene múltiples inversiones que suprimen esta condición de manera eficiente, permitiendo así la viabilidad de la población de este mutante letal recesivo. Además, este cromosoma balanceador cuenta con un marcador dominante que permite distinguir a los individuos que lo portan (Hentges y Justice, 2004).

En el ensayo SMART es posible utilizar la progenie proveniente de dos cruzas: 1) la cruza estándar (ST) y 2) la cruza de alta bioactivación (HB). La cruza ST es la cruza entre individuos machos *mwh* y hembras *flr*^{3} (Graf *et al*., 1984). La cruza HB, creada por Frölich y Würgler (1989), se caracteriza por el uso de la cepa *ORR* de *D. melanogaster* que proviene de una línea Oregon R (R) con resistencia al DDT (Dapkus y Merell, 1977) y que posee un alto nivel constitutivo de citocromos P450 (Hällström y Blanck, 1985); esta cruza se realiza con individuos machos *mwh* y hembras *ORR*;*flr*^{3} de *D. melanogaster* (Graf y van Schaik, 1992) y se emplea para la detección de promutágenos, compuestos que se activan vía metabolismo dependiente de citocromos P450 (Frölich y Würgler, 1989).

El ensayo SMART es una prueba de genotoxicidad *in vivo* versátil y eficiente debido a que ofrece ciertas ventajas: (1) es de bajo costo y se realiza en un lapso corto con una sola generación de *D. melanogaster*; (2) muestra una gran flexibilidad en los protocolos de

administración del compuesto a ensayar (Graf *et al.*, 1998; Spanó y Graf, 1998); (3) detecta varios tipos de eventos de mutación; (4) revela la recombinación mitótica (Vogel *et al*., 1980; Graf *et al.*, 1984); y (5) posibilita la comparación entre la actividad recombinogénica y la mutagénica del compuesto a evaluar (Frei *et al*., 1992). Además, es sensible a un gran número de compuestos químicos y mezclas complejas, de las cuales se han analizado más de 400 (Graf *et al*., 1998; Vogel *et al*., 1998), así como también facilita la detección de promutágenos y procancerígenos (Frölich y Würgler, 1989; Graf y van Schaik, 1992), lo que lo hace ideal también para estudios de antigenotoxicidad (Graf *et al.*, 1998).

Clasificación de las manchas

Los tipos de manchas que se pueden encontrar en las alas de *D. melanogaster* con el ensayo SMART son los siguientes (Graf *et al.*, 1984):

- Mancha sencilla: esta mancha manifiesta el fenotipo de uno de los dos marcadores (*mwh* o *flr*^{3}), pueden ser pequeñas (de 1-2 células) o grandes (3 o más células).
    - Mancha *mwh*: presenta células con el fenotipo *mwh*, es decir, con tres tricomas o más (Figura 6A); se excluyen las células con dos tricomas ya que éstas parecen formarse independientemente de la mutación *mwh*, no obstante, son consideradas si se encuentran dentro o en el margen de una mancha *mwh*.
    - Mancha *flr*^{3}: presenta células con el fenotipo *flr*^{3}, es decir, con tricomas que en manchas grandes pueden mostrar varias morfologías: puntiaguda, corta, gruesa, amórfica e incluso globosa de material quitinoso melanótico (Figura 6B); no suelen observarse manchas pequeñas de este tipo debido a que la mutación *flr*^{3} no se expresa, o al menos no completamente, en clones menores a cuatro células (Szabad *et al.*, 1983).
- Mancha gemela: este tipo de mancha expresa conjuntamente los fenotipos de *flr*^{3} y *mwh* (Figura 6C).

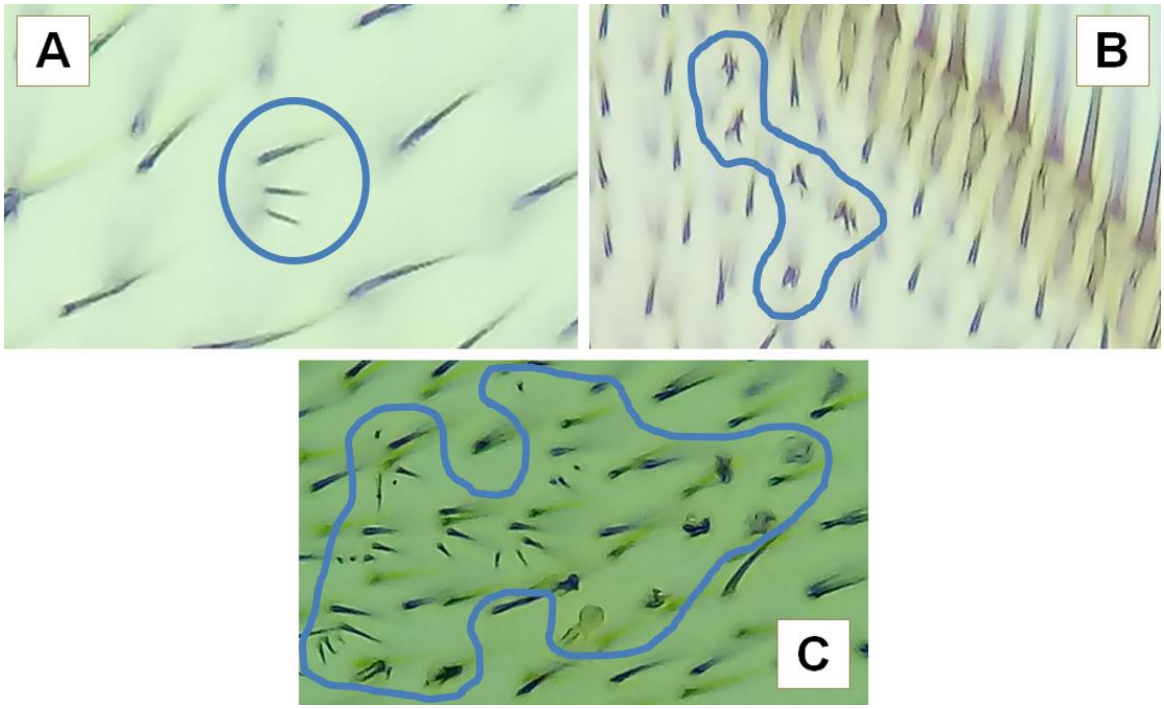
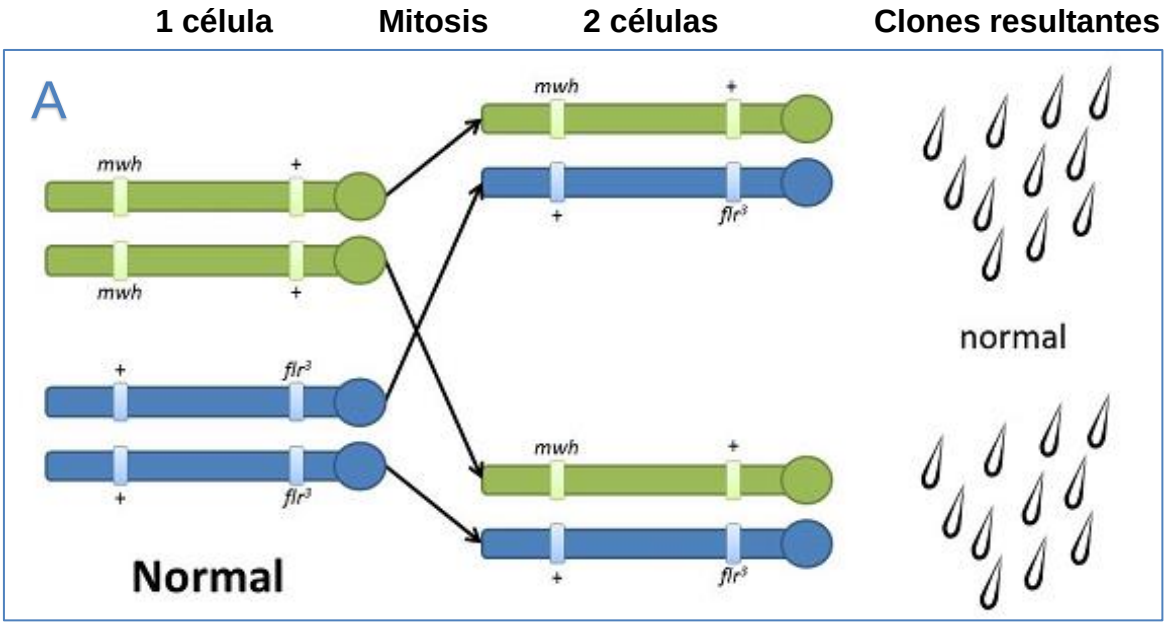
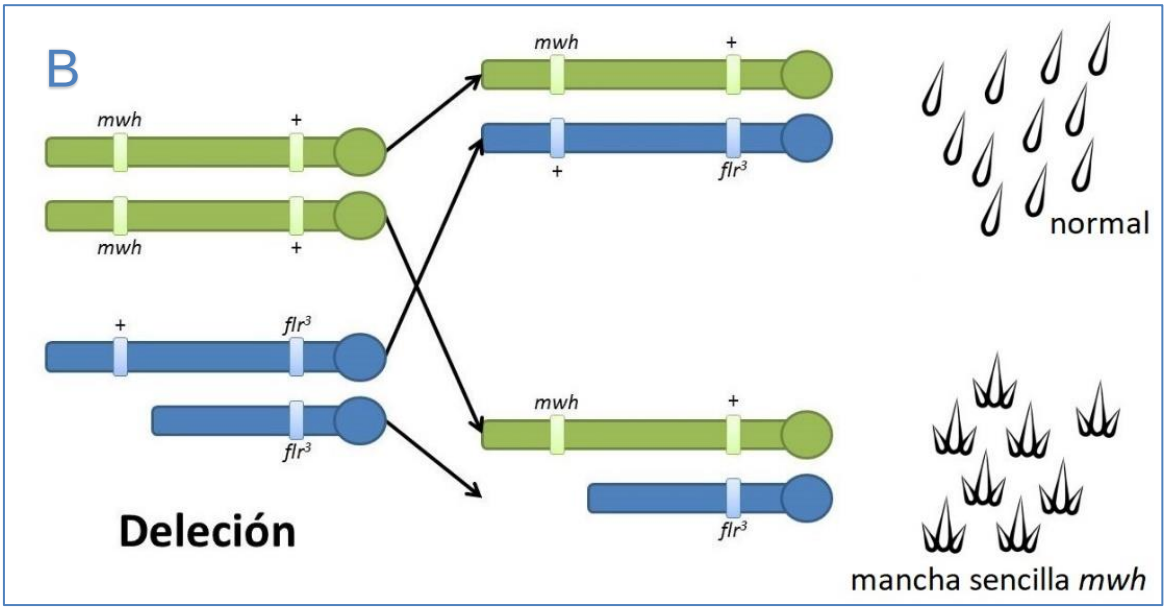


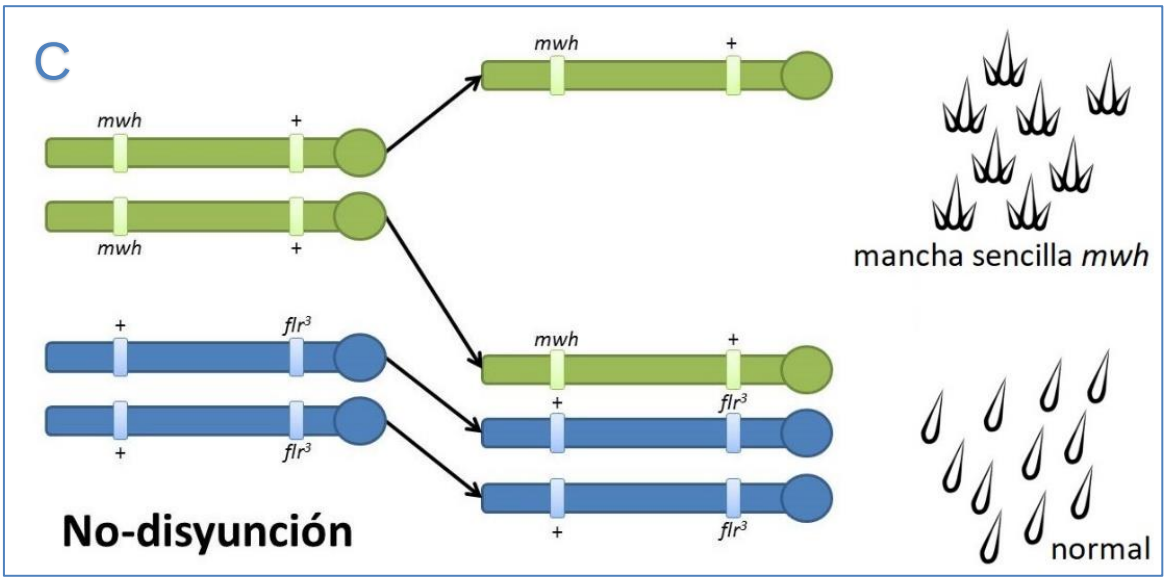
Figura 6. Tipos de manchas en las alas de individuos trans-heterocigotos de *D. melanogaster* en el ensayo SMART: A) mancha sencilla *mwh*, B) mancha sencilla *flr*^{3} y C) mancha gemela.

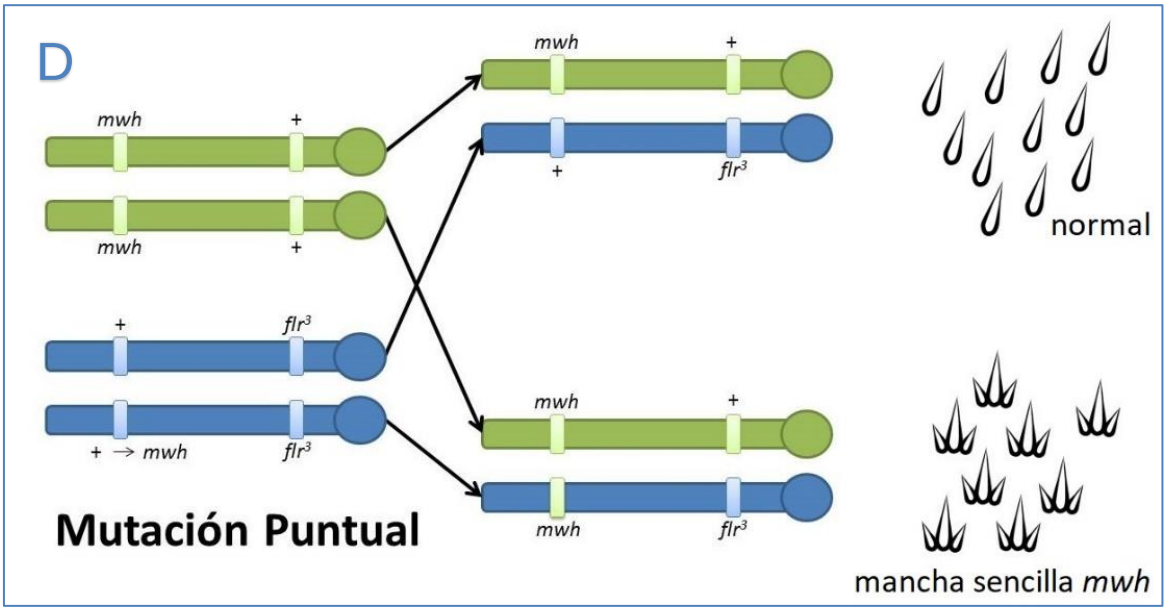
Mecanismos de formación de manchas

Las manchas sencillas son resultado de eventos genéticos tales como deleción, no-disyunción, mutación puntual y recombinación entre los marcadores *mwh* y *flr*^{3}; en cambio, las manchas gemelas sólo pueden originarse a través de un evento de recombinación entre el centrómero y el marcador *flr*^{3} (Graf *et al.*, 1984). Estos mecanismos se resumen en la Figura 7.




B
mwh
+
mwh
+
+
flr3
mwh
+
flr3
+
mwh
+
flr3
Deleción
normal
mancha sencilla mwh


C
mwh
+
mwh
+
+
flr3
+
flr3
mwh
+
flr3
+
flr3
No-disyunción
mancha sencilla mwh
normal


D
mwh
+
mwh
+
+
flr3
+ → mwh
flr3
mwh
+
flr3
mwh
flr3
Mutación Puntual
normal
mancha sencilla mwh

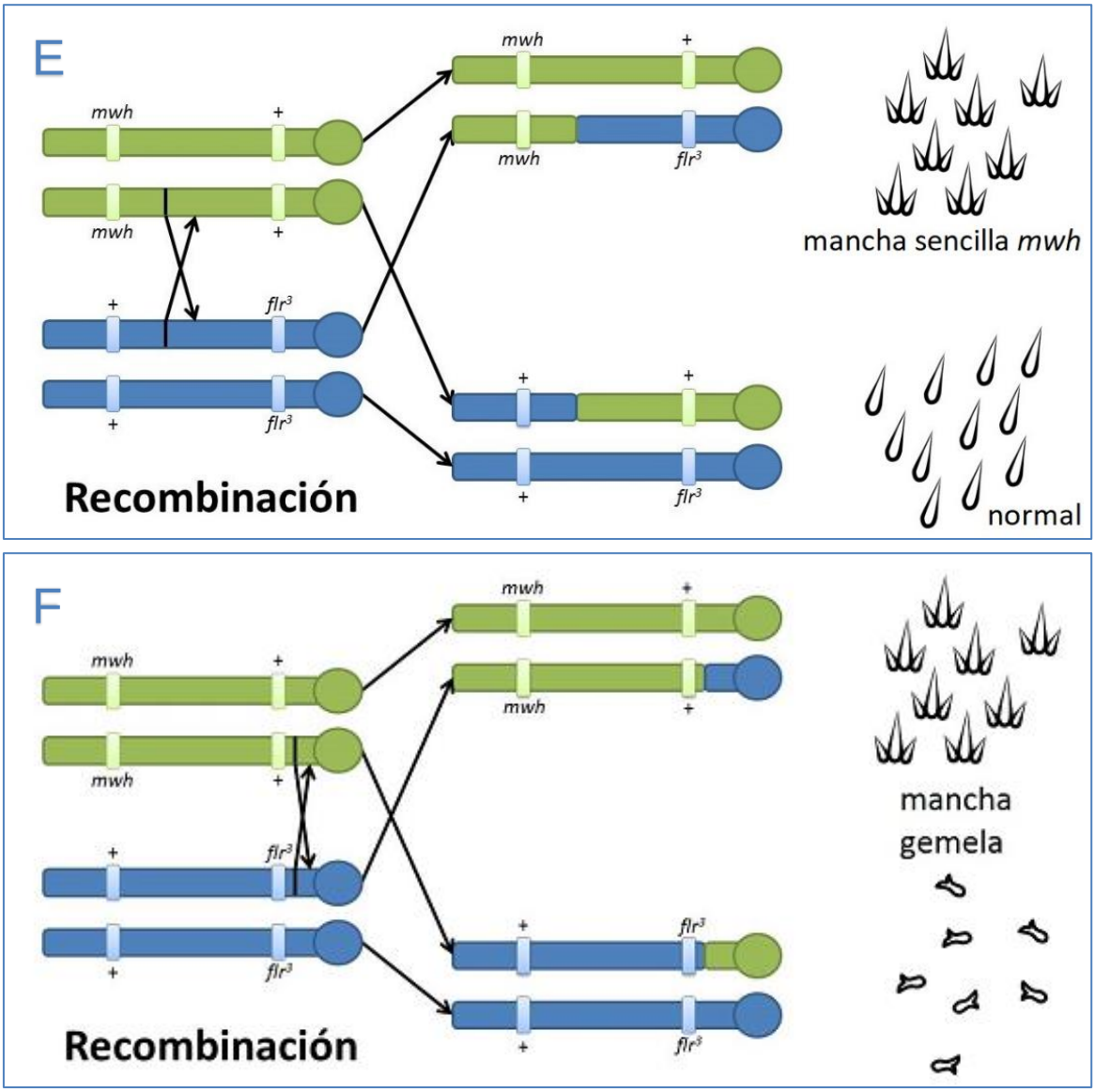


Figura 7. Mecanismos de formación de manchas en las alas de individuos trans-heterocigotos de *D. melanogaster* en el ensayo SMART. Los eventos de (B) deleción, (C) no-disyunción, (D) mutación puntual y (E) recombinación dan origen a manchas sencillas *mwh* o, por vías análogas, a manchas sencillas *flr*^{3} (no se ilustra); las manchas gemelas solo se forman por un evento de (F) recombinación entre el marcador *flr*^{3} y el centrómero. Modificado de Graf *et al*. (1984).

II. Objetivos

Objetivo general

- Determinar si la decocción de semillas de *D. stramonium* posee un efecto genotóxico a través del ensayo SMART en las alas de *D. melanogaster*.

Objetivos particulares

- Determinar la concentración letal media (CL_{50}) de la decocción de semillas de *D. stramonium* en *D. melanogaster*.
- Determinar si el posible efecto genotóxico de la decocción de semillas de *D. stramonium* depende de un proceso de bioactivación empleando las cruzas ST y HB en el ensayo SMART.
- Determinar si existe un efecto antigenotóxico en la decocción de semillas de *D. stramonium* ante el daño producido por el mutágeno 4NQO en *D. melanogaster*.

III. Hipótesis

- Si la administración de la decocción de semillas de *D. stramonium* resulta en un aumento significativo de la frecuencia de manchas obtenidas en las alas de *D. melanogaster* del grupo experimental con respecto al grupo testigo, entonces las semillas de *D. stramonium* podrán clasificarse como genotóxicas en el ensayo SMART.

IV. Material y métodos

Compuestos químicos

Los compuestos químicos N-óxido de 4-nitroquinolina (CAS 56-57-5) y Tween 80 (CAS 9005-65-6) se obtuvieron en Sigma-Aldrich Química, S. de R.L. de C.V., Toluca de Lerdo, México.

Obtención de las semillas

Las semillas de *D. stramonium*, colectadas en Ticumán, Morelos, fueron donadas por el Dr. Juan Servando Núñez Farfán del Laboratorio de Genética Ecológica y Evolución del Instituto de Ecología, UNAM.

Preparación del extracto de semillas

Para evaluar el potencial genotóxico de las semillas de *D. stramonium* se empleó una decocción para obtener el extracto, ya que es uno de los métodos de administración oral utilizados en la medicina tradicional mexicana para esta parte de la planta (Morton, 1981; Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana, 2009).

La decocción se preparó con 24 g de semillas de *D. stramonium* y 100 mL de agua destilada, para obtener una concentración del 24% (% m/v). Las semillas se cocieron en el agua destilada a una temperatura de 40 °C durante 24 h mientras se producía burbujeo con una bomba de aire, con el objeto de desprender los compuestos de la semilla mediante el movimiento, además, el recipiente se mantuvo tapado con una película autoadherente de plástico asegurada con cinta adhesiva durante todo el procedimiento. Cabe mencionar que, para evitar que el volumen final del extracto no se viese afectado por la evaporación parcial o completa del agua, se agregó a la decocción una tercera parte más de agua. Finalmente, se procedió a colar la decocción y se conservó la fase acuosa, con la cual se prepararon las demás concentraciones.

Determinación de la concentración letal media (CL_{50})

La concentración letal media (CL_{50}) es la concentración de un agente químico que se requiere para causar la muerte del 50% de la población de prueba, se usa para medir la potencia o intensidad tóxica de diferentes sustancias químicas. A diferencia de la dosis letal media (DL_{50}), que se refiere a la cantidad del agente químico de estudio utilizada en cada miembro de la población de prueba, la CL_{50} se emplea cuando se desconoce cuánto consumió cada individuo

de la población, pero se conoce la concentración de la sustancia de ensayo (Canadian Centre for Occupational Health and Safety, 2013).

Se realizó una prueba de letalidad para determinar la CL_{50} y así definir las concentraciones que se utilizarían para evaluar el efecto genotóxico del extracto acuoso de semillas de *D. stramonium*. Se prepararon 28 mL de decocción de semillas al 24% de concentración para realizar diluciones con agua destilada con el objeto de obtener las concentraciones a probar (Tabla 1).

Tabla 1. Diluciones utilizadas para la determinación de la CL_{50}.

Concentración	Agua destilada (mL)	Decocción de semillas (mL)	Volumen final (mL)
Control	16	0	16
6%	12	4	16
12%	8	8	16
24%	0	16	16

De cada una de estas concentraciones, se utilizaron 2.5 mL para hidratar viales que contenían 0.5 g de medio instantáneo Carolina® cada uno. Estos viales se prepararon por triplicado para cada concentración y cruza (ST y HB). En cada vial se agregaron 10 larvas de tercer estadio de *D. melanogaster* de las cruzas correspondientes. Se registró la sobrevivencia de los adultos que emergieron para cada concentración y cruza con el fin de trazar una curva de sobrevivencia.

Grupo testigo

Control positivo

Para el control positivo se usó el N-óxido de 4-nitroquinolina (4NQO), un derivado de la quinolina que tiene propiedades mutagénicas y carcinogénicas, y que es capaz de inducir lesiones en el DNA similares a las generadas por la luz UV, mediante la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) que derivan de su biotransformación en la célula (Kartasova *et al*., 1987; Arima *et al*., 2006; Brüsehafer *et al*., 2016). Además, este compuesto es genotóxico en el ensayo SMART para las cruzas ST y HB (Graf *et al.*, 1989; Heres-Pulido *et al.*, 2004; Castañeda-Sortibrán *et al*., 2015).

Para este experimento se empleó una solución de 2 *m*M de 4NQO para ambas cruzas. Se diluyeron 23 mg del compuesto en 3 mL de etanol y 1 mL de Tween 80 empleando un agitador magnético en un reóstato a 100 rpm y a 100 °C. Una vez evaporado el etanol, se agregaron 60 mL de medio de cultivo a la solución y se distribuyó en cuatro frascos.

Control negativo

Para el control negativo se utilizaron 60 mL de agua destilada distribuidos en cuatro frascos con 3 g de medio instantáneo Carolina® cada uno.

Se realizó otro control negativo, control técnico, que consistió en contener el solvente utilizado en la preparación del control positivo. Para ello, se diluyeron 3 mL de etanol y 1 mL de Tween 80 empleando un agitador magnético en un reóstato a 100 rpm y a 100 °C. Una vez evaporado el etanol, se agregaron 60 mL de agua destilada y se distribuyó en cuatro frascos que contenían 3 g de medio instantáneo Carolina® cada uno.

Prueba de antigenotoxicidad

Con el fin de evaluar si la decocción de semillas de *D. stramonium* presenta un efecto antigenotóxico al interactuar con otro compuesto que es mutagénico, se realizó un cotratamiento con ambas cruzas, donde se utilizó el mutágeno 4NQO a una concentración de 2 *m*M y la decocción de semillas de *D. stramonium* a la concentración más alta (24%).

Para este experimento se prepararon 60 mL de decocción de semillas al 24% y se reservaron. Posteriormente, se realizó la solución de 4NQO, etanol y Tween 80 como se describió con anterioridad y, una vez que se evaporó el etanol, se agregaron los 60 mL de la decocción de semillas al 24% y se distribuyó en cuatro frascos con 3 g de medio instantáneo Carolina® cada uno.

Ensayo SMART

Cruzas y sincronización

Para el ensayo SMART se trabajó con la progenie de las siguientes cruzas de *D. melanogaster* (Graf y van Schaik, 1992):

- Cruza estándar (ST): hembras vírgenes *flr^3/TM3, Bd^S* y machos *mwh/mwh.*
- Cruza de alta bioactivación (HB): hembras vírgenes *ORR/ORR; flr^3/TM3, Bd^S* y machos *mwh/mwh.*

TM3 es el cromosoma balanceador y *Bd*^{S} (“beaded serrate” o “borde aserrado”) es el marcador dominante visible que lo distingue (Hentges y Justice, 2004) caracterizado por expresarse fenotípicamente como alas con muescas en las puntas (Lindsley y Zimm, 1992).

Estas cruzas se realizaron en una proporción de hembras:machos de 2:1, con 600 hembras vírgenes y 300 machos de *D. melanogaster*, repartidas en doce frascos con medio de cultivo donde cada uno contenía 50 hembras vírgenes y 25 machos. Estas moscas se mantuvieron en medio de cultivo a base de sacarosa y levadura durante 6 h. Posteriormente, los progenitores se retiraron dejando solo los huevos.

Tratamiento de las larvas

Las larvas de tercer estadio (72 ± 3 h) se extrajeron de los frascos con ayuda de una solución de sacarosa al 20% y se lavaron con agua corriente empleando una malla fina de nailon.

Las larvas de tercer estadio provenientes de ambas cruzas se expusieron a un tratamiento crónico (48 h) con el extracto acuoso de la semilla de *D. stramonium*, producto de la decocción, con las concentraciones 3, 6, 12 y 24% por triplicado, empleando medio instantáneo Carolina®. En el caso de los frascos realizados para los controles (positivo, técnico y negativo) y el cotratamiento, solo se realizaron duplicados por cruza.

Cuando los individuos tratados de *D. melanogaster* alcanzaron el estadio adulto, se sacrificaron con un eterizador y almacenaron en una solución de etanol al 70%, separándolos por sexo y fenotipo del ala.

Montado de las alas

Las alas de las moscas trans-heterocigotas, caracterizadas por presentar un fenotipo silvestre, fueron separadas para adherirlas sobre un portaobjetos con la ayuda de solución Fauré (30 g de goma arábiga, 20 mL de glicerol, 50 g de hidrato de cloral, 50 mL de agua). En cada portaobjetos se colocaron las alas de 10 hembras y 10 machos (Figura 8). Posteriormente, la laminilla se colocó en el horno (a 60 °C) dentro de una caja Petri, para protegerla del polvo, hasta que secara la solución Fauré permitiendo que las alas se adhieran firmemente al portaobjetos. Después, se cubrieron las alas con un cubreobjetos empleando una gota de solución de Fauré para fijarlo y, finalmente, sellarlo con ayuda de esmalte transparente para uñas (Graf *et al*., 1984). Las laminillas se hicieron por triplicado para cada concentración de semilla de *D. stramonium*, el grupo testigo y el cotratamiento, para ambas cruzas.

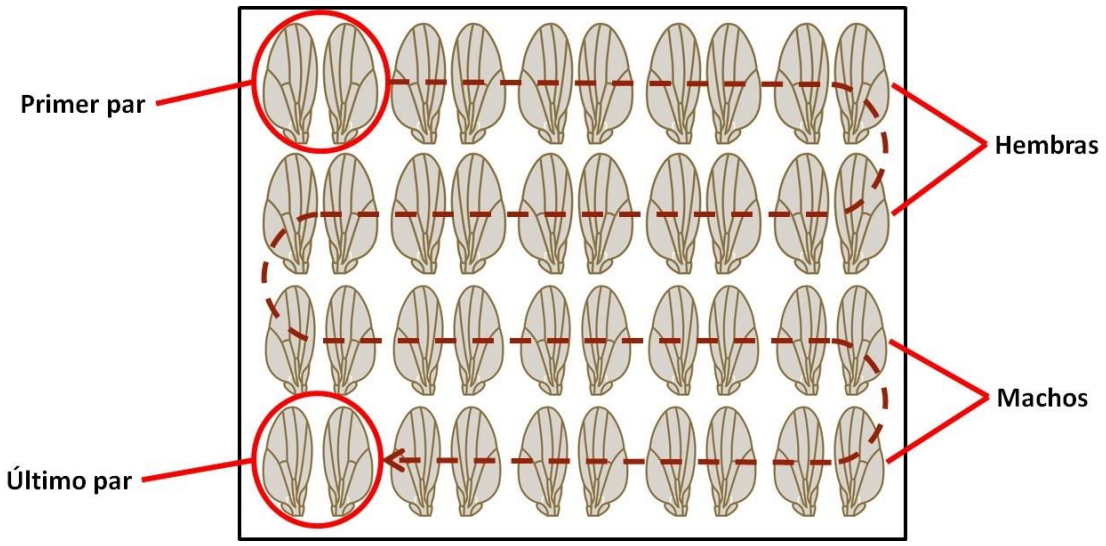


Figura 8. Orden de las alas de *D. melanogaster* por preparación. La flecha punteada indica el sentido en el que se realiza el análisis de las alas. Modificado de Carballo-Ontiveros (2010).

Análisis de las muestras

Cada una de las alas se analizó por microscopía óptica para registrar el tipo, tamaño y número de las manchas con los marcadores *mwh* y *flr*^{3}, tanto en la superficie dorsal como en la ventral, siguiendo el sentido que se muestra en la Figura 8. El registro de las manchas se realizó de acuerdo a su posición en el ala, para ello, ésta se dividió en siete regiones acorde a su venación (Figura 9).

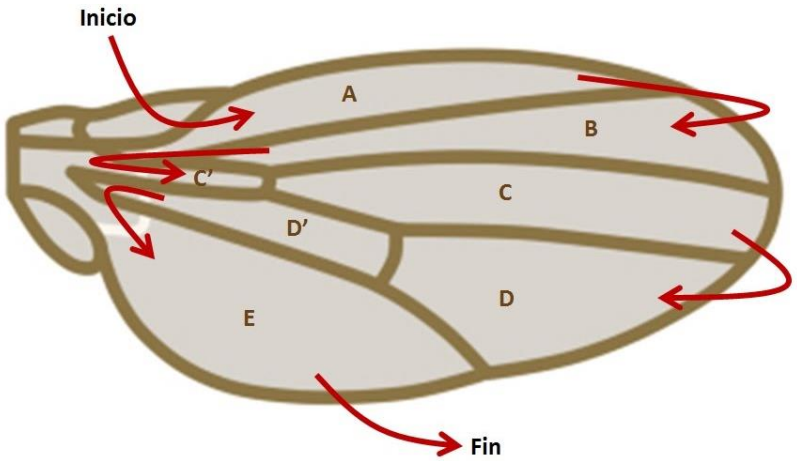


Figura 9. Regiones de la superficie del ala de *D. melanogaster*. La flecha indica el sentido en el que se realiza el análisis de las alas. Modificado de García-Bellido y Merriam (1971).

Cuando se obtuvieron los datos de las laminillas correspondientes a cada concentración de semilla de *D. stramonium*, al grupo testigo y al cotratamiento, para ambas cruzas, éstos se analizaron con el software de análisis estadístico llamado SMART v2.0 basado en la prueba Kastenbaum-Bowman (p= 0.05), desarrollado por Frei y Würgler (1988).

V. Resultados

Determinación de la CL_{50}

En primera instancia, se realizó la prueba con las concentraciones 0.5, 1, 2 y 4% en ambas cepas, donde se contabilizaron los sobrevivientes de cada vial para estimar el porcentaje de supervivencia el cual se mantuvo en el intervalo de 80-100% para todas las concentraciones y sus duplicados (Figura 10).

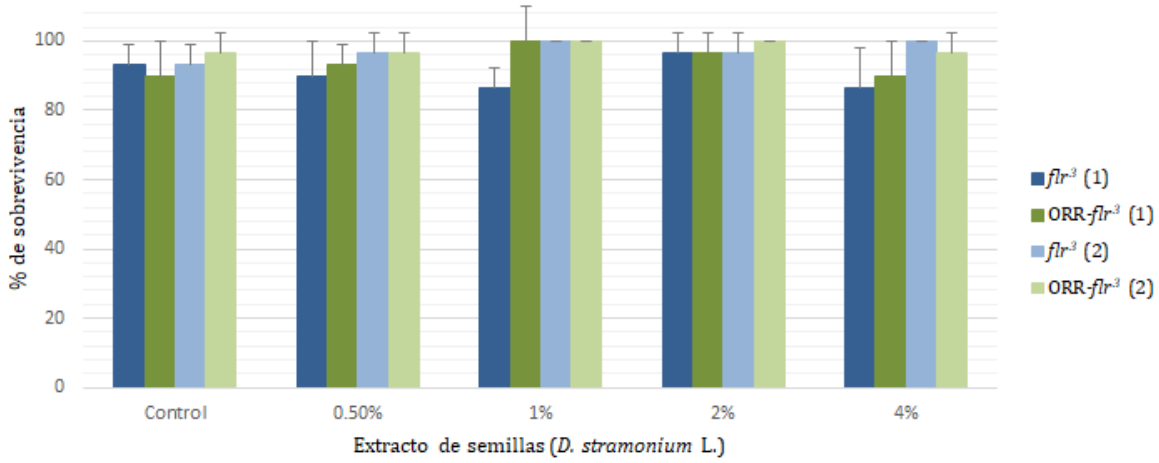


Figura 10. Porcentaje de sobrevivencia de *D. melanogaster* ante la administración de las concentraciones 0.5, 1, 2 y 4% de decocción de semilla de *D. stramonium*. Los datos se muestran con desviación estándar (N = 3).

Debido a que las concentraciones ensayadas no permitieron determinar la CL_{50} (Figura 10), se decidió aumentar la concentración máxima, probando entonces con 6, 12 y 24%. Sin embargo, los resultados (Figura 11) fueron similares a los de la Figura 10; el porcentaje de sobrevivencia se mantenía dentro del intervalo 80-100%.

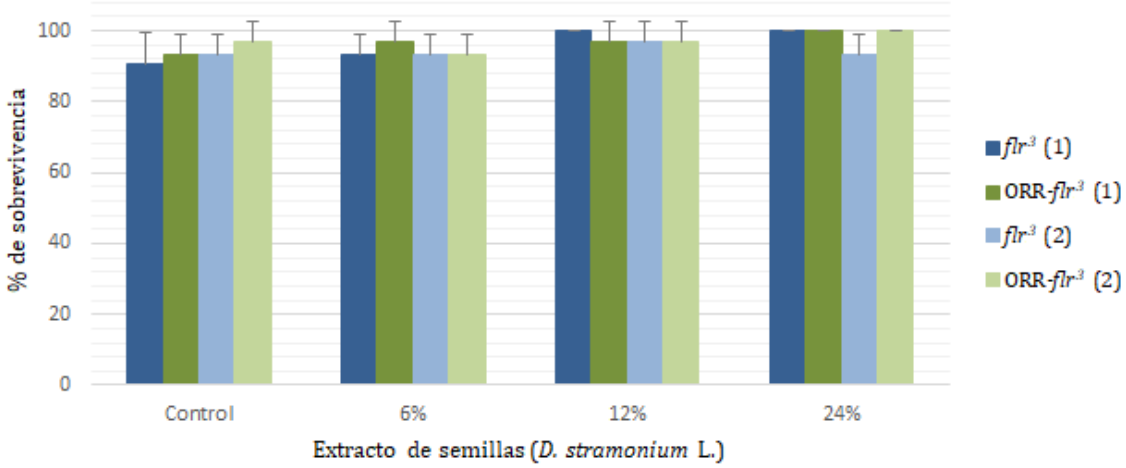


Figura 11. Porcentaje de sobrevivencia de *D. melanogaster* ante la administración de las concentraciones 6, 12 y 24% de decocción de semilla de *D. stramonium*. Los datos se muestran con desviación estándar (N = 3).

A pesar de que no fue posible determinar la CL_{50}, se decidió usar las concentraciones 24, 12, 6 y 3% para el ensayo SMART ya que la metodología utilizada para obtener el extracto impedía alcanzar concentraciones más elevadas (a mayor concentración se perdía más agua).

Ensayo SMART

Genotoxicidad

Los resultados del ensayo SMART de ambas cruzas (Tablas 2 y 3) se obtuvieron con el software de análisis estadístico SMART v2.0 (Frei y Würgler, 1988), donde los individuos de *D. melanogaster* fueron tratados con cuatro diferentes concentraciones de decocción de semillas de *D. stramonium* (3, 6, 12 y 24%), se utilizó agua destilada como control negativo y 4NQO como control positivo, además del control técnico (Tween 80 + Etanol).

Tabla 2. Resultados del ensayo SMART y cotratamiento para la cruza ST.

Concentración del compuesto	No. de moscas	Manchas por ala (No. de manchas)Ω				Manchas con clones *mwh*	Media por ciclo de división celular
		Manchas pequeñas m = 2	Manchas grandes m = 5	Manchas gemelas m = 5	Total de manchas m = 2		
Control negativo (H_2O)	60	0.37 (22)	0.02 (1)	0.02 (1)	0.40 (24)	24	1.75
Control técnico (Tween 80 + Etanol)	60	0.32 (19)	0.03 (2)	0.03 (2)	0.38 (23)	22	1.64
Toloache 3%	54	0.91 (49)+	0.15 (8)+	0.07 (4)-	1.13 (61)+	61	1.84
Toloache 6%	60	0.88 (53)+	0.15 (9)+	0.08 (5)-	1.12 (67)+	67	1.82
Toloache 12%	59	1.05 (62)+	0.14 (8)+	0.03 (2)-	1.22 (72)+	72	1.54
Toloache 24%	60	1.22 (73)+	0.18 (11)+	0.02 (1)-	1.42 (85)+	85	1.65
Control positivo (4NQO 2 *m*M)	60	1.67 (100)+	0.92 (55)+	0.33 (20)+	2.92 (175)+	161	2.60
Cotratamiento (4NQO 2 *m*M + Toloache 24%)	60	1.40 (84)+	0.65 (39)+	0.25 (15)+	2.30 (138)+	130	2.16

Ω Diagnósticos estadísticos de acuerdo a Frei y Würgler (1988, 1995); donde (m) = factor de multiplicación de riesgo mínimo para la evaluación de resultados negativos; (+) = positivo; (-) = negativo.

En ambas cruzas se observa que la frecuencia del total de manchas de todas las concentraciones ensayadas de decocción de semillas de *D. stramonium* es significativamente mayor a la del grupo testigo, puesto que los resultados son positivos. Esto indica que la

decocción de semillas de *D. stramonium* es genotóxica, al menos en las concentraciones manejadas. Además, para todas las concentraciones ensayadas, se observa que no hubo un aumento significativo en la frecuencia de manchas de la cruza HB (Tabla 3) al compararla con la frecuencia de manchas de la cruza ST (Tabla 2), lo que indica que la decocción de semillas de *D. stramonium* no requiere ser bioactivada para mostrar su genotoxicidad.

Tabla 3. Resultados del ensayo SMART y cotratamiento para la cruza de HB.

Concentración del compuesto	**No. de moscas**	**Manchas por ala (No. de manchas)[Ω]**				**Manchas con clones *mwh***	**Media por ciclo de división celular**
		Manchas pequeñas m = 2	**Manchas grandes m = 5**	**Manchas gemelas m = 5**	**Total de manchas m = 2**		
Control negativo (H_2O)	60	0.38 (23)	0.00 (0)	0.02 (1)	0.40 (24)	24	1.67
Control técnico (Tween 80 + Etanol)	60	0.47 (28)	0.03 (2)	0.02 (1)	0.52 (31)	31	1.52
Toloache 3%	60	0.52 (31)-	0.10 (6)+	0.03 (2)-	0.65 (39)+	39	2.05
Toloache 6%	60	0.55 (33)-	0.10 (6)+	0.03 (2)-	0.68 (41)+	41	1.93
Toloache 12%	60	0.67 (40)+	0.08 (5)+	0.03 (2)-	0.78 (47)+	46	1.76
Toloache 24%	60	0.75 (45)+	0.10 (6)+	0.08 (5)-	0.93 (56)+	55	1.80
Control positivo (4NQO 2 *m*M)	60	1.18 (71)+	0.37 (22)+	0.10 (6)-	1.65 (99)+	95	2.13
Cotratamiento (4NQO 2 *m*M + Toloache 24%)	60	1.25 (75)+	0.33 (20)+	0.07 (4)-	1.65 (99)+	96	1.96

Ω Diagnósticos estadísticos de acuerdo a Frei y Würgler (1988, 1995); donde (m) = factor de multiplicación de riesgo mínimo para la evaluación de resultados negativos; (+) = positivo; (-) = negativo.

En todas las concentraciones se observa que la presencia de manchas sencillas pequeñas (1 a 2 células afectadas) es mayor a la de manchas sencillas grandes (más de 2 células afectadas) en ambas cruzas, como se aprecia en las Figuras 12 y 13. Además, no se registraron manchas sencillas *flr*^{3} en la cruza ST, pero sí se encontraron dos de ellas en la cruza HB. En ambas cruzas se presentaron algunas manchas gemelas, aunque su presencia no fue estadísticamente significativa.

Antigenotoxicidad

Los resultados de la prueba de antigenotoxicidad de ambas cruzas (Tablas 2 y 3) se obtuvieron con el software de análisis estadístico SMART v2.0 (Frei y Würgler, 1988), donde los individuos de *D. melanogaster* fueron tratados con la decocción de semillas de *D. stramonium* al 24% y el mutágeno 4NQO al 2 *m*M de manera simultánea con el fin de detectar un posible efecto antigenotóxico.

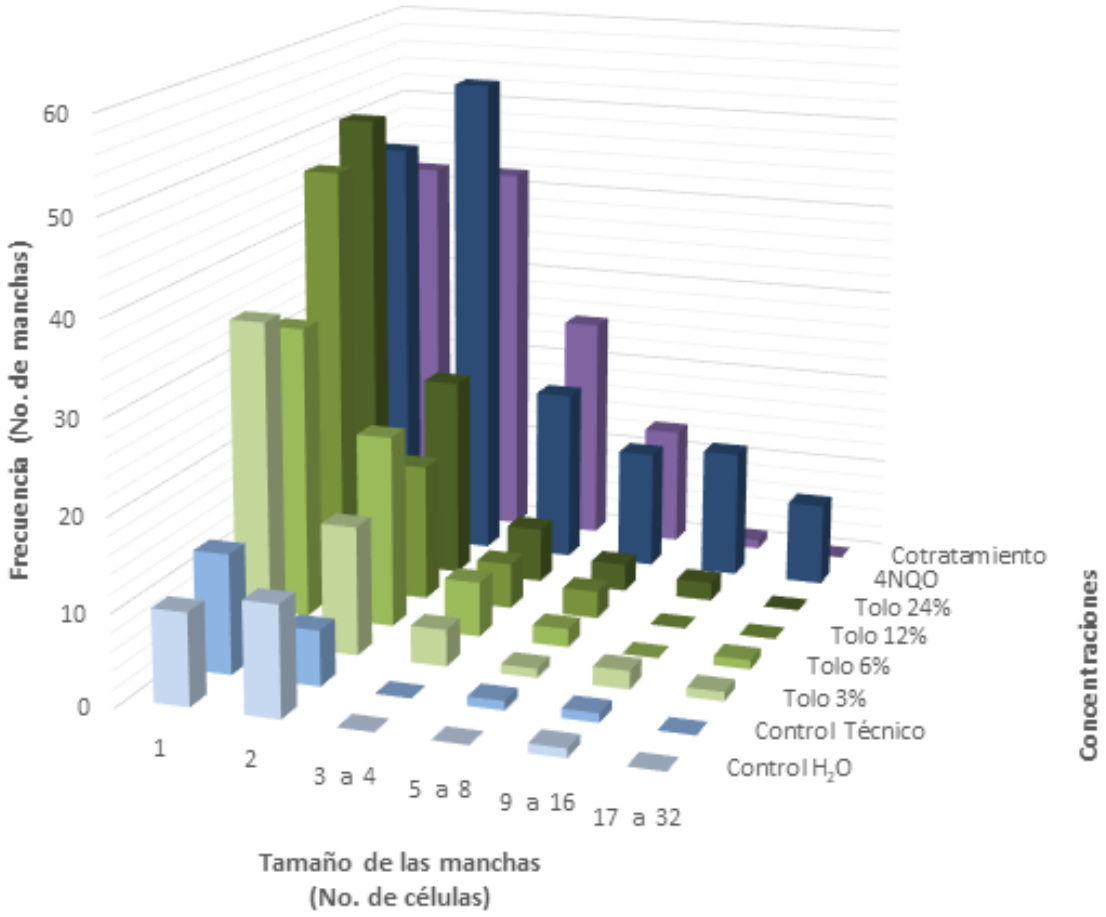


Figura 12. Distribución por tamaño de las manchas sencillas obtenidas de las diferentes concentraciones de la decocción de semillas de *D. stramonium*, del grupo testigo y del cotratamiento para la cruza ST.

En ambas cruzas (Tablas 2 y 3), la frecuencia del total de manchas del cotratamiento es similar a la del control positivo, no existe una diferencia estadísticamente significativa, esto indica que la decocción de semillas de *D. stramonium* no posee un efecto antigenotóxico y tampoco potencializa la genotoxicidad del mutágeno. Además, se observa que la presencia de manchas sencillas pequeñas y grandes del cotratamiento es similar a la del control positivo, con excepción de las manchas sencillas más grandes registradas (de 9 a 16 y de 17 a 32 células afectadas), esto se aprecia en las Figuras 12 y 13.

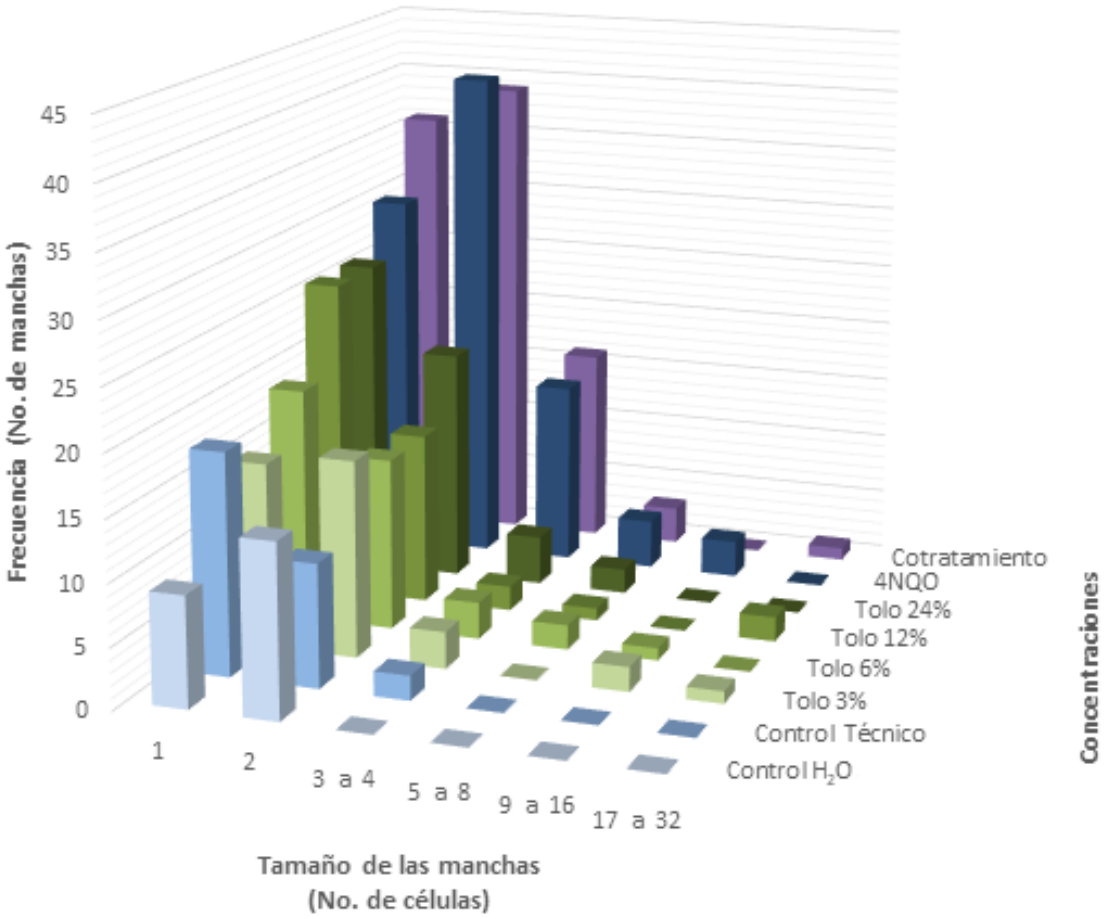


Figura 13. Distribución por tamaño de las manchas sencillas obtenidas de las diferentes concentraciones de la decocción de semillas de *D. stramonium*, del grupo testigo y del cotratamiento para la cruza HB.

VI. Discusión

Concentración letal media (CL_{50})

Los datos obtenidos en la prueba CL_{50} mostraron que la decocción de semillas de *D. stramonium* no presenta toxicidad letal a una concentración máxima de 24% ya que sobrevivió más del 80% de la población de estudio, debido a esto no fue posible determinar el valor de la CL_{50} y se tomó la decisión de utilizar las concentraciones 24, 12, 6 y 3% para el ensayo SMART, a causa de que la metodología usada para conseguir el concentrado de decocción de semillas impedía alcanzar concentraciones más elevadas, es decir, mientras más se saturaba el medio acuoso con las semillas la pérdida de agua era mayor.

Genotoxicidad

Las plantas medicinales son un elemento importante del conocimiento médico tradicional, heredado por generaciones desde tiempos prehispánicos, en varias culturas mexicanas (Heinrich *et al*., 1998); habiéndose registrado aproximadamente 3 000 especies (De la Cruz, 1991) y estimándose 4 500, México se ubica como el segundo país con la mayor diversidad biológica de estas plantas (Bye *et al*., 1995). En la actualidad, se estima que la población mexicana hace uso de alrededor de 1 000 especies de estas plantas, de las cuales solo el 20% se ha estudiado ampliamente para validar de manera científica su uso (García-Alvarado *et al.*, 2001) y aproximadamente el 5% del total (4 500 especies) se validó por sus atributos medicinales (Ocegueda *et al*., 2005).

Esta tendencia al uso frecuente de la herbolaria por parte de la población mexicana y a la escasa información científica de este tipo de plantas, en especial a nivel toxicológico (García-Alvarado *et al.*, 2001), más el pensamiento popular de que la medicina tradicional es antagónica a la científica (Menéndez, 1994), son algunas de las razones por las que se considera fundamental ampliar los conocimientos relacionados con las propiedades tanto beneficiosas como perjudiciales de las plantas medicinales en las aplicaciones médicas, para así complementar y/o actualizar la información que se tiene de la herbolaria mexicana y para facilitar la toma de decisiones y la planificación de estrategias de salud alternativa (Ocegueda *et al*., 2005).

Como una forma de contribuir al crecimiento de este banco de datos, se realizó el presente estudio donde se determinó el potencial genotóxico de la decocción de semillas de *D. stramonium* por medio del ensayo SMART en las alas de *D. melanogaster* utilizando las

cruzas estándar (ST) y de alta bioactivación (HB), esta última para determinar si la decocción de semillas de esta planta era dependiente de una activación metabólica para revelar su potencial genotóxico. Se eligió el método de decocción para obtener el extracto acuoso de las semillas debido a que es uno de los métodos de administración oral usado para esta parte de la planta dentro de la medicina tradicional mexicana (Morton, 1981; Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana, 2009).

Los datos obtenidos en el ensayo SMART para la cruza ST (Tabla 2) tratada con la decocción de semillas de *D. stramonium* muestran resultados positivos para las manchas pequeñas, grandes y el total de manchas en todas las concentraciones, y negativos para las manchas gemelas. En cuanto a la cruza HB (Tabla 3), se exhiben resultados positivos para las manchas grandes y el total de manchas en todas las concentraciones, y negativos para las manchas gemelas; en las manchas pequeñas solo son positivos en las concentraciones de 12 y 24%, además de que en esta cruza no hubo un aumento significativo en la frecuencia de manchas en comparación con la cruza ST, por lo que la decocción de semillas de *D. stramonium* se puede descartar como promutágeno. Con base en esto, podemos decir que la decocción de semillas de *D. stramonium* presenta un efecto genotóxico en este bioensayo.

Respecto al tipo de manchas, en todas las concentraciones utilizadas predominó la presencia de manchas sencillas pequeñas, mientras que las manchas sencillas grandes presentaron frecuencias continuamente decrecientes (Figuras 12 y 13), lo que era de esperarse debido a la alimentación crónica de las larvas de tercer estadio con el extracto acuoso hasta la pupación, ya que en esta etapa del ciclo de vida de *D. melanogaster* los discos imaginales (grupo de células epiteliales en la larva que dan lugar a las estructuras del adulto durante la metamorfosis) están creciendo y por tanto una mayor cantidad de células blanco son expuestas al extracto (Graf *et al.*, 1984; Morgan, 2007). Las manchas gemelas tuvieron una frecuencia baja, se obtuvieron resultados negativos en todas la concentraciones ensayadas en ambas cruzas para este tipo de manchas (Tablas 2 y 3).

D. stramonium es una de las plantas medicinales más usadas y comercializadas en México por sus efectos analgésicos (Khalili y Atyabi, 2004), sus semillas son la parte de la planta que presenta mayor toxicidad en el ser humano debido a su concentración de alcaloides tropánicos (Nehaul, 1955; Urich *et al*., 1982; Boumba *et al*., 2004; Diker *et al*., 2007; Spina y Taddei, 2007). La atropina es el alcaloide tropánico más abundante en las semillas de *D. stramonium* y en toda la planta, seguido por la escopolamina (Miraldi *et al*., 2001); ambos compuestos han

demostrado ser genotóxicos en células humanas (Yu *et al*., 1988; Svobodova *et al*., 2011), por lo que es posible que hayan incidido en el aumento de la frecuencia de manchas en el ensayo SMART debido a la homología genética que presenta *D. melanogaster* con el ser humano. Sin embargo, dado que se ha demostrado que la decocción prolongada de plantas solanáceas reduce su toxicidad, debido a que el hervor degrada parcial o totalmente algunos alcaloides tropánicos (Ng *et al*., 2013; Marín-Sáez *et al*., 2019), no es posible confirmar si los compuestos activos y la metodología que se utilizó en este trabajo han inferido en los resultados del experimento, ya que se desconoce la concentración de alcaloides del extracto que se empleó.

Los resultados obtenidos en este estudio concuerdan con los obtenidos en estudios previos realizados por Steenkamp *et al*. (2005) y Akal *et al.* (2014) que evaluaron el potencial genotóxico de las semillas de *D. stramonium* en linfocitos humanos. Dentro de las diferencias entre dichos estudios y el presente trabajo (Tabla 4) destaca que este es el primer estudio de genotoxicidad *in vivo* realizado con esta planta, esto es importante ya que el realizar ambos estudios (*in vivo* e *in vitro*) ayuda a confirmar el potencial genotóxico de una planta medicinal y enfatiza la importancia de obtener una gama más amplia de pruebas de genotoxicidad (Sponchiado *et al*., 2016), como en el caso del anacardo (*Anacardium occidentale*) que mostró resultados negativos en un ensayo *in vitro* con *S. typhimurium* (Melo-Cavalcante *et al*., 2003) y positivos en uno *in vivo* con ratones (Konan *et al*., 2007), o viceversa, como en el caso del ajenjo (*Artemisia absinthium*) con resultados positivos en *S. typhimurium* (Taherkhani, 2014) y negativos en ratones (Piloto-Ferrer *et al*., 2000); en este caso las semillas de *D. stramonium* han mostrado tanto resultados negativos (Friedman y Henika, 1991; Reid *et al*., 2006; Verschaeve y Van Staden, 2008) como positivos (Steenkamp *et al*., 2005; Akal *et al*., 2014) en pruebas *in vitro*, por lo que se puede decir que este estudio, realizado con una prueba *in vivo*, reafirma el efecto genotóxico de esta planta medicinal. Además, este trabajo también es el primer estudio de genotoxicidad de *D. stramonium* que utilizó muestras colectadas en México, lo cual es importante remarcar debido a que, como se mencionó antes, existe la posibilidad de que los componentes activos (atropina y escopolamina) de *D. stramonium* hayan influido en los resultados del ensayo SMART y la localidad donde se colectó la planta es uno de los factores que inciden en la variación de su concentración de alcaloides tropánicos (Benítez *et al.*, 2018; Castillo *et al*., 2019). Es conveniente tomar en cuenta los sitios de colecta de las muestras de esta planta y la concentración de alcaloides de los extractos empleados para

futuros estudios de genotoxicidad, con el fin de analizar si existe una relación directa entre la concentración de alcaloides y el potencial genotóxico de *D. stramonium*.

Tabla 4. Estudios realizados sobre la genotoxicidad (resultados positivos) de las semillas de *D. stramonium*.

Autor(es)	**Modelo biológico**	**Ensayo de genotoxicidad**	**Tipo de estudio**	**Eventos genéticos que detecta el ensayo**	**Procedencia de la planta**	**Tipo de extracto**
Steenkamp *et al*. (2005)	Linfocitos humanos	Ensayo Cometa	*in vitro*	Rompimiento de la cadenas de DNA (Schrader, 2003)	Johanesburgo, Sudáfrica	Acuoso y metanólico
Akal *et al*. (2014)	Linfocitos humanos	Prueba de Intercambio de Cromátidas Hermanas	*in vitro*	Aumento en el intercambio de DNA entre dos cromátidas hermanas (Schrader, 2003)	Konya, Turquía	Metanólico
Núñez-Ledezma (2021)	*Drosophila melanogaster*	Ensayo de Mutación y Recombinación Somática (SMART)	*in vivo*	Deleción, no-disyunción, mutación puntual y recombinación (Graf *et al*., 1984)	Ticumán, Morelos, México	Acuoso

Al comparar este estudio con otros trabajos donde se evaluó el potencial genotóxico de plantas medicinales con el ensayo SMART, *D. stramonium* ha demostrado ser genotóxica en extracto acuoso, junto con el epazote (*Dysphania ambrosioides*), el cilantro (*Coriandrum sativum*), el perejil (*Petroselinum crispum*), el pequi (*Caryocar brasiliense*), el llantén (*Plantago major*), el alisio blanco (*Turnera subulata*) y un híbrido de *Spondias* (*Spondias mombin* × *S. tuberosa*); y también mostró un efecto genotóxico desde concentraciones muy bajas, junto con el pequi, el perejil, el alisio blanco y el híbrido de *Spondias* (Dutra-Pimenta y Nepomuceno, 2005; Castro *et al*., 2008; Castañeda-Sortibrán *et al*., 2015; Senes-Lopes *et al*., 2018). Por lo que es una planta con la que se debe tener precaución, sobre todo para usos medicinales.

Antigenotoxicidad

Para complementar este estudio, se realizó un cotratamiento administrando simultáneamente el mutágeno 4NQO a una concentración de 2 *m*M y la decocción de semillas de *D. stramonium* a la concentración más alta (24%), a las larvas de *D. melanogaster* en el ensayo SMART, con el objetivo de evaluar si *D. stramonium* presenta un efecto protector ante el daño genético

inducido por el mutágeno. Hasta donde se investigó, las semillas de *D. stramonium* presentan propiedades antioxidantes, antihiperglicémicas y anticancerígenas (Iqbal *et al*., 2017; Melaku y Amare, 2020).

Los resultados de la frecuencia total de manchas del cotratamiento, tanto para la cruza ST como para la HB (Tablas 2 y 3), no presentan diferencias significativas con el control positivo (4NQO), incluso el número de manchas sencillas pequeñas, sencillas grandes y gemelas son estadísticamente similares (Figuras 12 y 13). Esto indica que la decocción de semillas de *D. stramonium* no presenta un efecto antigenotóxico en el ensayo SMART, al menos ante el daño inducido por el mutágeno 4NQO.

VII. Conclusiones

- El porcentaje de sobrevivencia obtenido en la prueba de letalidad al usar la decocción de semillas de *D. stramonium* oscila entre 80 y 100%, por lo que no fue posible calcular la CL_{50}.
- Los resultados obtenidos en este estudio indican que la decocción de semillas de *D. stramonium* es genotóxica en todas las concentraciones utilizadas para el total de manchas en ambas cruzas (ST y HB) en el ensayo SMART en *D. melanogaster*.
- Se determinó que no existen diferencias significativas en el potencial genotóxico de la decocción de semillas de *D. stramonium* entre las cruzas ST y HB en el ensayo SMART, por lo que se concluye que la decocción no requiere de una activación metabólica para mostrar su efecto genotóxico.
- Las semillas de *D. stramonium* contienen compuestos químicos que pudieron incidir en el aumento de la frecuencia de manchas en las alas de *D. melanogaster* mediante el ensayo SMART.
- Se demostró que no hubo diferencias significativas entre el control positivo (4NQO) y el cotratamiento con la decocción de semillas de *D. stramonium*, de modo que se infiere que la decocción no presentó un efecto antigenotóxico.

VIII. Referencias bibliográficas

Abolaji, A. O., Kamdem, J. P., Farombi, E. O., Rocha, J. B. T. (2013). *Drosophila melanogaster* as a promising model organism in toxicological studies. *Archives of Basic and Applied Medicine*, 1:33-38.

Aguilar, A., Camacho, J.R., Chino, S., Járquez, P., López, M.E. (1994). Herbario Medicinal del Instituto Mexicano del Seguro Social. México: IMSS.

Akal, Z. Ü., Gürkan, S., Alpsoy, L., Yildiz, A. (2014). Evaluation of cytotoxic and genotoxic effects of *Datura stramonium* extracts on cultured human lymphocytes. *Medicinal and Aromatic Plants*, 3(4):170. doi: 10.4172/2167-0412.1000170

Akinmoladun, A. C., Olaleye, M. T., Farombi, E. O. (2014). Cardiotoxicity and cardioprotective effects of African medicinal plants. En: Kuete, V. (ed.). *Toxicological survey of African medicinal plants* (pp. 395-421). Reino Unido: Elsevier.

Alcorn, J. B. (1984). Huastec Mayan ethnobotany. EUA: University of Texas Press.

Arima, Y., Nishigori, C., Takeuchi, T., Oka, S., Morimoto, K., Utani, A., Miyachi, Y. (2006). 4-Nitroquinoline 1-oxide forms 8-hydroxydeoxyguanosine in human fibroblasts through reactive oxygen species. *Toxicological Sciences*, 91(2):382-392. doi: 10.1093/toxsci/kfj161

Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana. (2009). Toloache, *Datura stramonium* L. [en línea]. México: UNAM. [Consultado: 7 Oct 2017]. Disponible en: <http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/apmtm/termino.php?l=3&t=datura-stramonium>

Benítez, G., March-Salas, M., Vill-Kamel, A., Cháves-Jiménez, U., Hernández, J., Montes-Osuna, N., Moreno-Chocano, J., Cariñanos, P. (2018). The genus *Datura* L. (Solanaceae) in Mexico and Spain - Ethnobotanical perspective at the interface of medical and illicit uses. *Journal of Ethnopharmacology*, 219:133-151. doi: 10.1016/j.jep.2018.03.007

Berkov, S., Philipov, S. (2002). Alkaloid production in diploid and autotetraploid plants of *Datura stramonium*. *Pharmaceutical Biology*, 40(8):617-621. doi: 10.1076/phbi.40.8.617.14650

Boumba, V. A., Mitselou, A., Vougiouklakis, T. (2004). Fatal poisoning from ingestion of *Datura stramonium* seeds. *Veterinary and Human Toxicology*, 46(2):81-82.

Broadley, K. J., Kelly, D. R. (2001). Muscarinic receptor agonists and antagonists. *Molecules*, 6(3):142-193. doi: 10.3390/60300142

Bruneton, J. (2001). Farmacognosia: fitoquímica, plantas medicinales. 2ª ed. España: Editorial Acribia, S. A.

Brunton, L. L., Chabner, B., Knollmann, B. C. (2011). Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics. 12ª ed. EUA: McGraw-Hill Education.

Brüsehafer, K., Manshian, B. B., Doherty, A. T., Zaïr, Z. M., Johnson, G. E., Doak, S. H., Jenkins, G. J. S. (2016). The clastogenicity of 4NQO is cell-type dependent and linked to cytotoxicity, length of exposure and p53 proficiency. *Mutagenesis*, 31(2):171-180. doi: 10.1093/mutage/gev069

Bye, R., Linares, E., Estrada, E. (1995). Biological diversity of medicinal plants in Mexico. En: Arnason, J. T., Mata, R., Romeo, J. T. (ed.). *Phytochemistry of medicinal plants* (pp. 65-82). EUA: Springer.

Canadian Centre for Occupational Health and Safety. (2013). What is a LD_{50} and LC_{50}? [en línea]. Canadá: CCOHS. [Consultado: 7 Oct 2017]. Disponible en: <http://www.ccohs.ca/oshanswers/chemicals/ld50.html>

Carballo-Ontiveros, M.A. (2010). Evaluación del potencial genotóxico de diversos extractos de *Tecoma stans* en las células somáticas de *Drosophila melanogaster*. Tesis de Licenciatura (Biología). Facultad de Ciencias, UNAM, México.

Castañeda-Sortibrán, A. N., Ordaz-Téllez, M. G., 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*. *Advanced Techniques in Biology and Medicine*, S1:002. doi: 10.4172/2379-1764.S1-002

Castillo, G., Cruz, L. L., Hernández-Cumplido, J., Oyama, K., Flores-Ortiz, C. M., Fornoni, J., Valverde, P. L., Núñez-Farfán, J. (2013). Geographic association and temporal variation of chemical and physical defense and leaf damage in *Datura stramonium*. *Ecological Research*, 28(4):663-672. doi: 10.1007/s11284-013-1059-4

Castillo, G., Calahorra-Oliart, A., Núñez-Farfán, J., Valverde, P. L., Arroyo, J., Cruz, L. L., Tapia-López, R. (2019). Selection on tropane alkaloids in native and non-native populations of *Datura stramonium*. *Ecology and Evolution*, 9(18):10176-10184. doi: 10.1002/ece3.5520

Castro, A. J. S., Grisolia, C. K., De Araújo, B. C., Dias, C. D., Dutra, E. S., Nepomuceno, J. C. (2008). Recombinogenic effects of the aqueous extract of pulp from pequi fruit (*Caryocar brasiliense*) on somatic cells of *Drosophila melanogaster*. *Genetics and Molecular Research*, 7(4):1375-1383. doi: 10.4238/vol7-4gmr515

Centers for Disease Control and Prevention. (1995). Epidemiologic notes and reports jimson weed poisoning -- Texas, New York, and California, 1994. *Morbidity and Mortality Weekly Report*, 44(03):41-44.

Dapkus, D., Merrell, D. J. (1977). Chromosomal analysis of DDT-resistance in a long-term selected population of *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, 87(4):685-697.

De la Cruz, M. (1991). *Libellus de medicinalibus indorum herbis*: manuscrito azteca de 1552, según traducción latina de Juan Badiano (versión española con estudios y comentarios por diversos autores). México: IMSS.

Demerec, M. (1950). Biology of *Drosophila*. EUA: CSHL Press.

Diker, D., Markovitz, D., Rothman, M., Sendovski, U. (2007). Coma as a presenting sign of *Datura stramonium* seed tea poisoning. *European Journal of Internal Medicine*, 18(4):336-338. doi: 10.1016/j.ejim.2006.09.035

Dutra-Pimenta, V. M. S., Nepomuceno, J. C. (2005). Genotoxicity testing of *Plantago major* extracts in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 45(1):56-61. doi: 10.1002/em.20079

Eger, E. I. (1962). Atropine, scopolamine, and related compounds. *The Journal of the American Society of Anesthesiologists*, 23(3):365-383. doi: 10.1097/00000542-196205000-00012

El Bazaoui, A., Bellimam, M. A., Soulaymani, A. (2011). Nine new tropane alkaloids from *Datura stramonium* L. identified by GC/MS. *Fitoterapia*, 82(2):193-197. doi: 10.1016/j.fitote. 2010.09.010

El Bazaoui, A., Stambouli, H., Bellimam, M. A., Soulaymani, A. (2009). Determination of tropane alkaloids in seeds of *Datura stramonium* L. by GC/MS and LC/MS. *Annales de Toxicologie Analytique*, 21(4):183-188. doi: 10.1051/ata/2009051

Elzenga, G. (1957). Influence of external factors on the alkaloid content in some medicinal plants. *Pharmaceutisch Weekblad*, 92:767-775.

Figueroa-Morales, N. (2008). Compilación sobre los usos medicinales del toloache (*Datura inoxia* P. Mill.) en México. *Tlahui-Medic*, (27).

Frei, H., Clements, J., Howe, D., Würgler, F. E. (1992). The genotoxicity of the anti-cancer drug mitoxantrone in somatic and germ cells of *Drosophila melanogaster*. *Mutation Research/Genetic Toxicology*, 279(1):21-33. doi: 10.1016/0165-1218(92)90262-X

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/Environmental Mutagenesis and Related Subjects*, 203(4):297-308. doi: 10.1016/0165-1161(88)90019-2

Frei, H., Würgler, F. E. (1995). Optimal experimental design and sample size for the statistical evaluation of data from somatic mutation and recombination tests (SMART) in *Drosophila*. *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects*, 334(2):247-258. doi: 10.1016/0165-1161(95)90018-7

Friedman, M., Henika, P. R. (1991). Mutagenicity of toxic weed seeds in the Ames test: jimson weed (*Datura stramonium*), velvetleaf (*Abutilon theophrasti*), morning glory (*Ipomoea* spp.), and sicklepod (*Cassia obtusifolia*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 39(3):494-501. doi: 10.1021/jf00003a013

Friedman, M., Levin, C. E. (1989). Composition of jimson weed (*Datura stramonium*) seeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 37(4):998-1005. doi: 10.1021/jf00088a040

Frölich, A., Würgler, F. E. (1989). New tester strains with improved bioactivation capacity for the *Drosophila* wing-spot test. *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects*, 216(3):179-187. doi: 10.1016/0165-1161(89)90003-4

Gaire, B. P., Subedi, L. (2013). A review on the pharmacological and toxicological aspects of *Datura stramonium* L. *Journal of Integrative Medicine*, 11(2):73-79. doi: 10.3736/jintegrmed2013016

García-Alvarado, J. S., Verde-Star, M. J., Heredia, N. L. (2001). Traditional uses and scientific knowledge of medicinal plants from Mexico and Central America. *Journal of Herbs, Spices and Medicinal Plants*, 8(2-3):37-89. doi: 10.1300/J044v08n02_02

García-Bellido, A., Merriam, J. R. (1971). Parameters of the wing imaginal disc development of *Drosophila melanogaster*. *Developmental Biology*, 24(1):61-87. doi: 10.1016/0012-1606(71)90047-9

Glatt, H., Jung, R., Oesch, F. (1983). Bacterial mutagenicity investigation of epoxides: drugs, drug metabolites, steroids and pesticides. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 111(2):99-118. doi: 10.1016/0027-5107(83)90056-8

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 and Molecular Mutagenesis*, 6(2):153-188. doi: 10.1002/em.2860060206

Graf, U., Frei, H., Kägi, A., Katz, A. J., Würgler, F. E. (1989). Thirty compounds tested in the *Drosophila* wing spot test. *Mutation Research/Genetic Toxicology*, 222(4):359-373. doi: 10.1016/0165-1218(89)90112-2

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. doi: 10.1016/0165-1161(92)90032-H

Graf, U., Abraham, S. K., Guzmán-Rincón, J., Würgler, F. E. (1998). Antigenotoxicity studies in *Drosophila melanogaster*. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 402(1-2):203-209. doi: 10.1016/S0027-5107(97)00298-4

Günaydin, Y. K., Yildiz, C. G., Işikoğlu, V., Kokulu, K., Muraçar, N., Akilli, N. B., Köylü, R., Cander, B. (2017). *Datura stramonium* poisoning: two case reports. *Journal of Emergency Medicine Case Reports*, 8(1):4-6. doi: 10.5152/jemcr.2016.1471

Hällström, I., 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(2-3):157-171. doi: 10.1016/0009-2797(85)90003-1

Heinrich, M., Ankli, A., Frei, B., Weimann, C., Sticher, O. (1998). Medicinal plants in Mexico: healers' consensus and cultural importance. *Social Science and Medicine*, 47(11):1859-1871. doi: 10.1016/S0277-9536(98)00181-6

Hentges, K. E., Justice, M. J. (2004). Checks and balancers: balancer chromosomes to facilitate genome annotation. *TRENDS in Genetics*, 20(6):252-259. doi: 10.1016/j.tig.2004.04.004

Heres-Pulido, M. E., Dueñas-García, I., Castañeda-Partida, L., Sánchez-García, A., Contreras-Sousa, M., Durán-Díaz, A., 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. doi: 10.1093/mutage/geh020

Iqbal, S., Sivaraj, C., Gunasekaran, K. (2017). Antioxidant and anticancer activities of methanol extract of seeds of *Datura stramonium* l. *Free Radicals and Antioxidants*, 7(2):184-189. doi: 10.5530/fra.2017.2.28

Kartasova, T., Cornelissen, B. J. C., Belt, P., Van de Putte, P. (1987). Effects of UV, 4NQO and TPA on gene expression in cultured human epidermal keratinocytes. *Nucleic Acids Research*, 15(15):5945-5962. doi: 10.1093/nar/15.15.5945

Khalili, N. M., Atyabi, S. M. (2004). Evaluation of analgesic effect of *Datura stramonium* seed extract in hot plate and formalin tested on male rats. *Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants*, 20(3):309-322.

Konan, N. A., Bacchi, E. M., Lincopan, N., Varela, S. D., Varanda, E. A. (2007). Acute, subacute toxicity and genotoxic effect of a hydroethanolic extract of the cashew (*Anacardium occidentale* L.). *Journal of Ethnopharmacology*, 110(1):30-38. doi: 10.1016/j.jep.2006.08.033

Kurzenko, N. (s.f.). Jimsonweed (*Datura stramonium*). Called devil's snare, hell's bells, devil's weed, tolguacha, jamestown weed, pricklyburr, devil's cucumber and thornapple also [Fotografía]. 123RF. Recuperado de: <https://es.123rf.com/photo_155333539_jimsonweed-datura-stramonium-called-devil-s-snare-hell-s-bells-devil-s-weed-tolguacha-jamestown-weed.html?term=datura%2Bstramonium&vti=mufaxtut9m40jpr1v0-1-8>

Lindsley, D. L., Zimm, G. G. (1992). The genome of *Drosophila melanogaster*. EUA: Academic Press, Inc.

Luna-Cavazos, M., Bye, R. (2011). Phytogeographic analysis of the genus *Datura* (Solanaceae) in continental Mexico. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 82(3):977-988.

Marín-Sáez, J., Romero-González, R., Frenich, A. G. (2016). Enantiomeric determination and evaluation of the racemization process of atropine in Solanaceae seeds and contaminated samples by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1474:79-84. doi: 10.1016/j.chroma.2016.10.047

Marín-Sáez, J., Romero-González, R., Frenich, A. G. (2019). Effect of tea making and boiling processes on the degradation of tropane alkaloids in tea and pasta samples contaminated with Solanaceae seeds and coca leaf. *Food Chemistry*, 287:265-272. doi: 10.1016/j.foodchem.2019.02.091

McCann, J., Choi, E., Yamasaki, E., Ames, B. N. (1975). Detection of carcinogens as mutagens in the *Salmonella*/microsome test: assay of 300 chemicals. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 72(12):5135-5139. doi: 10.1073/pnas.72.12.5135

Melaku, B. C., Amare, G. G. (2020). Evaluation of antidiabetic and antioxidant potential of hydromethanolic seed extract of *Datura stramonium* Linn (Solanaceae). *Journal of Experimental Pharmacology*, 12:181. doi: 10.2147/JEP.S258522

Melo-Cavalcante, A. A., Rubensam, G., Picada, J. N., da Silva, E. G., Fonseca-Moreira, J. C., Henriques, J. A. P. (2003). Mutagenicity, antioxidant potential, and antimutagenic activity against hydrogen peroxide of cashew (*Anacardium occidentale*) apple juice and cajuina. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 41(5):360-369. doi: 10.1002/em.10158

Menéndez, D. O. (1994). La enfermedad y la curación. ¿Qué es la medicina tradicional? *Alteridades*, 4(7):71-83.

Miraldi, E., Masti, A., Ferri, S., Comparini, I. B. (2001). Distribution of hyoscyamine and scopolamine in *Datura stramonium*. *Fitoterapia*, 72(6):644-648. doi: 10.1016/S0367-326X(01)00291-X

Mondragón-Pichardo, J. (2009). Malezas de México: *Datura stramonium* - Ficha informativa [en línea]. México: CONABIO. [Consultado: 21 Abr 2019]. Disponible en: <http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/solanaceae/datura-stramonium/fichas/ficha.htm>

Moreno-Pedraza, A., Gabriel, J., Treutler, H., Winkler, R., Vergara, F. (2019). Effects of water availability in the soil on tropane alkaloid production in cultivated *Datura stramonium*. *Metabolites*, 9(7):131. doi: 10.3390/metabo9070131

Morgan, D. O. (2007). The cell cycle: principles of control. Singapur: New Science Press Ltd. En asociación con: Oxford University Press y Sinauer Associates, Inc., Publishers.

Morton, J. F. (1981). Atlas of medicinal plants of Middle America: Bahamas to Yucatan. EUA: Charles C. Thomas Publisher.

Nakamura, S. I., Oda, Y., Shimada, T., Oki, I., Sugimoto, K. (1987). SOS-inducing activity of chemical carcinogens and mutagens in *Salmonella typhimurium* TA1535/pSK1002: examination with 151 chemicals. *Mutation Research Letters*, 192(4):239-246. doi: 10.1016/0165-7992(87)90063-7

Nehaul, B. B. G. (1955). *Datura* poisoning in British Guiana; report of four cases. *West Indian Medical Journal*, 4(1):57-59.

Nigenda, G., Mora-Flores, G., Aldama-López, S., Orozco-Núñez, E. (2001). La práctica de la medicina tradicional en América Latina y el Caribe: el dilema entre regulación y tolerancia. *Salud Pública de México*, 43(1):41-51.

Ng, S. W., Ching, C. K., Chan, A. Y. W., Mak, T. W. L. (2013). Simultaneous detection of 22 toxic plant alkaloids (aconitum alkaloids, solanaceous tropane alkaloids, sophora alkaloids, strychnos alkaloids and colchicine) in human urine and herbal samples using liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, 942-943:63-69. doi: 10.1016/j.jchromb.2013.10.020

Ocegueda, S., Moreno, E., Koleff, P. (2005). Plantas utilizadas en la medicina tradicional y su identificación científica. CONABIO. *Biodiversitas*, 62:12-15.

Piloto-Ferrer, J., Ramos-Ruiz, A., Vizoso-Parra, A., García-López, A. (2000). Evaluación del potencial genotóxico de un extracto fluido de incienso (*Artemisia absinthium* L.). *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 5(2):64-67.

Ramírez-Santos, J., Gómez-Eichelmann, C. (2003). Ácido desoxirribonucleico, DNA. En: Jiménez-García, L. F., Merchant-Larios, H. *Biología celular y molecular* (pp. 3-21). México: Pearson.

Reid, K. A., Maes, J., Maes, A., Van Staden, J., De Kimpe, N., Mulholland, D. A., Verschaeve, L. (2006). Evaluation of the mutagenic and antimutagenic effects of South African plants. *Journal of Ethnopharmacology*, 106(1):44-50. doi: 10.1016/j.jep.2005.11.030

Rumack, B. H. (1973). Anticholinergic poisoning: treatment with physostigmine. *Pediatrics*, 52(3):449-451.

Rzedowski, G. C., Rzedowski, J. (2001). Flora fanerogámica del Valle de México. 2ª ed. México: Instituto de Ecología, A. C. y CONABIO.

Schrader, T. J. (2003). Carcinogens | Carcinogenicity tests. En: Caballero, B., Trugo, L., Finglas, P. M. (ed.). *Encyclopedia of food sciences and nutrition, 2ª ed*. (pp. 920-927). Reino Unido: Academic Press.

Senes-Lopes, T. F., López, J. A., do Amaral, V. S., Brandão-Neto, J., de Rezende, A. A., Duarte da Luz, J. R., Guterres Z. R., Almeida, M. G. (2018). Genotoxicity of *Turnera subulata* and *Spondias mombin* × *Spondias tuberosa* extracts from Brazilian caatinga biome. *Journal of Medicinal Food*, 21(4):372-379. doi: 10.1089/jmf.2017.0041

Sever, M., Cekin, M. (2007). Anticholinergic intoxication due to *Datura stramonium*: three pediatric cases. *Akademik Acil Tıp Dergisi*, 5(4):128-301.

Silva-Ramos, C., García-Mier, B. E., Veloz-García, R. A. (2018). Estudio etnomédico de tres comunidades en el municipio de Salvatierra. *Jóvenes en la Ciencia*, 4(1):208-213.

Soler-Rodríguez, F., de la Casa-Resino, I., Pérez-López, M. (2012). El estramonio (*Datura stramonium*): una planta tóxica a tener en cuenta también en caballos. *Revista de la Asociación Extremeña de Criadores de Caballos de Pura Raza Española*, (12):27-31.

Spanó, M. A., Graf, U. (1998). Segundo taller sobre SMART: un método para detectar las actividades mutagénica y recombinogénica en células somáticas de *Drosophila»* en la Universidad Federal de Uberlandia (MG), Brasil. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 14(2):111-114.

Spina, S. P., Taddei, A. (2007). Teenagers with jimson weed (*Datura stramonium*) poisoning. *Canadian Journal of Emergency Medicine*, 9(6):467-469. doi: 10.1017/S14818035 00015530

Sponchiado, G., Adam, M. L., Silva, C. D., Soley, B. S., de Mello-Sampayo, C., Cabrini, D. A., Correr, C. J., Otuki, M. F. (2016). Quantitative genotoxicity assays for analysis of medicinal plants: a systematic review. *Journal of Ethnopharmacology*, 178:289-296. doi: 10.1016/j.jep.2015.10.026

Steenkamp, V., Grimmer, H., Semano, M., Gulumian, M. (2005). Antioxidant and genotoxic properties of South African herbal extracts. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 581:35-42. doi: 10.1016/j.mrgentox.2004.10.009

Stella, L., Vitelli, M. R., Palazzo, E., Oliva, P., De Novellis, V., Capuano, A., Scafuro, M. A., Berrino, L., Rossi, F., Maione, S. (2010). *Datura stramonium* intake: a report on three cases. *Journal of Psychoactive Drugs*, 42(4):507-512. doi: 10.1080/02791072.2010. 10400713

Svobodova, H., Jost, P., Stetina, R. (2011). Comparison of potential cytotoxicity and genotoxicity of selected antidotes against organophosphates inhibiting acetylcholinesterase. *Military Medical Science Letters*, 80(4):142-149. doi: 10.31482/mmsl.2011.020

Szabad, J., Soós, I., Polgár, G., Héjja, G. (1983). Testing the mutagenicity of malondialdehyde and formaldehyde by the *Drosophila* mosaic and the sex-linked recessive lethal tests. *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects*, 113(2):117-133. doi: 10.1016/0165-1161(83)90224-8

Taddei-Bringas, G. A., Santillana-Macedo, M. A., Romero-Cancio, J. A., Romero-Téllez, M. B. (1999). Aceptación y uso de herbolaria en medicina familiar. *Salud Pública de México*, 41(3):216-220. doi: 10.1590/S0036-36341999000300009

Taherkhani, M. (2014). Mutagenic and antimutagenic activities of *Artemisia absinthium* volatile oil by the bacterial reverse mutation assay in *Salmonella typhimurium* strains TA98 and TA100. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, 4(2):S840-S844. doi: 10.1016/S2222-1808(14)60739-8

Tonndorf, J., Hyde, R. W., Chinn, H. I., Lett, J. E. (1953). Absorption from nasal mucous membrane: systemic effect of hyoscine following intranasal administration. *Annals of Otology, Rhinology & Laryngology*, 62(3):630-641. doi: 10.1177/000348945306200302

Tønnesen, M. (1948). The absorption and distribution of atropine in rats. *Acta Pharmacologica et Toxicologica*, 4(3-4):367-378. doi: 10.1111/j.1600-0773.1948.tb03358.x

Ugur, B., Chen, K., Bellen, H. J. (2016). *Drosophila* tools and assays for the study of human diseases. *Disease Models & Mechanisms*, 9(3):235–244. doi: 10.1242/dmm.023762

UNIBIO: Colecciones Biológicas. (2007). "*Datura stramonium* L. - IBUNAM:MEXU: CHASMA56" [en línea]. México: Instituto de Biología, UNAM. [Consultado: 7 Oct 2017]. Disponible en: <http://unibio.unam.mx/collections/specimens/urn/IBUNAM:MEXU:CHASMA56>

Urich, R. W., Bowerman, D. L., Levisky, J. A., Pflug, J. L. (1982). *Datura stramonium*: a fatal poisoning. *Journal of Forensic Science*, 27(4):948-954. doi: 10.1520/JFS12217J

Vainillaychile. (s.f.). Estramonio (*Datura stramonium*) o estramonio. Frutos y semillas, Clouse [Fotografía]. 123RF. Recuperado de: <https://es.123rf.com/photo_70106451_estramonio-datura-stramonium-o-estramonio-frutos-y-semillas-clouse.html>

Verschaeve, L., Van Staden, J. (2008). Mutagenic and antimutagenic properties of extracts from South African traditional medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*, 119(3):575-587. doi: 10.1016/j.jep.2008.06.007

Villaseñor-Ríos, J. L., Espinosa-García, F. J. (1998). Catálogo de malezas de México. México: UNAM. En asociación con: CONACOFI y FCE.

Vogel, E. W., Blijleven, W. G. H., Klapwijk, P. M., Zijlstra, J. A. (1980). Some current perspectives of the application of *Drosophila* in the evaluation of carcinogens. En: Williams, G. M, Kroes, R., Waaijers, H. W., van de Poll, K. W. (ed.). *The predictive value of short-term screening tests in carcinogenicity evaluation* (pp. 125-147). Países Bajos: Elsevier/North-Holland Biomedical Press.

Vogel, E. W., Graf, U., Frei, H., Nivard, M. M. J. (1998). The results of assays in *Drosophila* as indicators of exposure to carcinogens. *IARC Scientific Publications*, (146):427-470.

Witte, L., Müller, K., Arfmann, H. A. (1987). Investigation of the alkaloid pattern of *Datura innoxia* plants by capillary gas-liquid-chromatography-mass spectrometry. *Planta Medica*, 53(2):192-197. doi: 10.1055/s-2006-962670

Yu, J. F., Yang, Y. S., Wang, W. Y., Xiong, G. X., Chen, M. S. (1988). Mutagenicity and teratogenicity of chlorpromazine and scopolamine. *Chinese Medical Journal*, 101(5):339-345.

Zocchi, A. (s.f.). Frutos espinosos de *Datura stramonium*, conocido como jimsonweed, trampa del diablo, campanas del infierno, trompeta, tolguacha, hierba de Jamestown, hedionda, lococalida, espinosa, pepino del diablo y thornapple es una planta de la familia de las solanáceas [Fotografía]. 123RF. Recuperado de: <https://es.123rf.com/photo_85653233_frutos-espinosos-de-datura-stramonium-conocido-como-jimsonweed-trampa-del-diablo-campanas-del-infier.html>