

40
2ej.

TESIS CON
FALLAS DE ORIGEN



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

**"ESTUDIO DEL EFECTO DE LA NEMORONA
Y LA DESMETIL-FRUTICULINA SOBRE LA
PERDIDA PARCIAL Y TOTAL DE
CROMOSOMAS (SCLT) EN
Drosophila melanogaster"**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

B I O L O G O

P R E S E N T A :

AMERICA NITXIN CASTAÑEDA SORTIBRAN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está 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.

INDICE

INDICE i

RESUMEN 1

INTRODUCCION 2

METODOLOGIA 12

Descripción de la prueba 12

Sistema de Cruzas 12

Químico 12

Vía de administración 12

Procedimiento experimental 13

Sistema de camadas 13

Medio de cultivo 14

Procedimiento estadístico 14

RESULTADOS 15

DISCUSION Y CONCLUSIONES 19

FIGURA, CUADROS Y TABLAS 22

AGRADECIMIENTOS 39

BIBLIOGRAFIA 40

RESUMEN

En el presente estudio se analizó el efecto de la nemorona y la desmetil fruticulina sobre la pérdida parcial y total de cromosomas sexuales en *Drosophila melanogaster*, utilizando el sistema de cruce de hembras y^{2w}/y^{2w} con machos y/B^+Y^+ , empleando el sistema de camadas.

La nemorona se administró por vía oral, en tanto que la desmetil-fruticulina se administró vía inyección y vía oral. Para la nemorona se probaron las siguientes concentraciones por alimentación 1000, 2500 y 5000 ppm, siendo el testigo Tween 80. La desmetil-fruticulina se probó en las siguientes concentraciones por inyección: 10, 50 y 100 ppm, siendo el testigo DMSO al 5%, y por alimentación 1000, 2500, 5000 ppm y 10 000 ppm el testigo en este caso fue Tween 80.

Los resultados se evaluaron mediante las tablas de Kastenbaum-Bowman a un nivel de significancia del 5%, encontrándose que tanto la nemorona como la desmetil-fruticulina no inducen pérdida parcial o total de cromosomas sexuales en las concentraciones probadas.

INTRODUCCION.

Los estudios sobre mutagénesis química que comenzaron en la década de los 60's, mostraron en un amplio rango de organismos experimentales que hay numerosos agentes químicos en el ambiente capaces de tener una potente actividad mutagénica. Se han encontrado agentes mutagénicos entre los químicos utilizados como aditivos de alimentos, medicamentos, cosméticos, pesticidas y en los contaminantes ambientales (De Serres, 1979).

El riesgo genético que representa para el hombre la presencia de estos compuestos en el medio es importante, dado el daño que se le puede ocasionar a un individuo a través de la inducción de mutaciones génicas y aberraciones cromosómicas en las células somáticas lo cual podría causar el desarrollo de un cáncer y/o también podría afectar a futuras generaciones a través de la producción de mutaciones génicas y aberraciones cromosómicas en las células germinales lo cual conllevaría a alteraciones heredables (Loprieno, 1980).

La incidencia de estos compuestos en el ambiente conduce a desarrollar metodologías sensibles y rápidas para detectarlos, así como a buscar alternativas para disminuir las concentraciones de los ya existentes en el ambiente. Una fuente adicional de preocupación acerca de la exposición humana a estos agentes es la alta correlación que se ha encontrado entre la actividad mutagénica y la carcinogénica (De Serres, 1979, Ames *et al.*, 1973, Maron y Ames, 1983). por lo que resulta de suma importancia el atender enfermedades asociadas con estos agentes como lo es el caso del cáncer (Pratt y Ruddon, 1979).

El cáncer es una enfermedad multifactorial que se caracteriza por la presencia de células malignas las cuales proliferan de una forma incontrolada, invadiendo tejidos circunvecinos y en ocasiones órganos distantes para formar colonias hijas (metástasis). Las células cancerosas presentan, además de su tendencia a multiplicarse, características bioquímicas e inmunológicas diferentes a las de las células normales. Entre estas diferencias están: la producción de hormonas ectópicas (hormonas que no son producidas por las células que les dieron origen, e. g. las hormonas placentarias producidas por carcinomas pulmonares), la presencia de grupos químicos específicos en la membrana celular. Esta forma de expresión diferente denota que en las células cancerosas, se activan genes que deberían estar inactivos y viceversa, por lo tanto, la desorganización en la expresión génica, es característica de la célula cancerosa (Vega, 1985).

Así como existen distintos tipos de células, existen alrededor de 100 clases de cánceres diferentes con características especiales según el tejido u órgano afectados, sin embargo con fines completamente prácticos se consideran en

general, tres tipos de cáncer:

1 Carcinomas.- Cáncer de las células epiteliales. Estas células recubren las superficies externas de distintos órganos: piel, tracto respiratorio, tracto gastrointestinal, entre otros) y las superficies internas de varias glándulas (glándula mamaria, páncreas, tiroides y otros) Aproximadamente un 90% de los cánceres humanos pertenecen a este grupo.

El 10% restante de los cánceres humanos se distribuyen en los dos grupos siguientes:

2 Sarcomas.- Cáncer de los tejidos conectivos o tejidos de soporte como son los cartilagos, los huesos, los músculos, etc.

3 Grupo heterogéneo.- En donde se incluye a los cánceres de los tejidos productores de las células sanguíneas: a) trastornos mieloproliferativos como las leucemias: cáncer de los tejidos formadores de las células sanguíneas que se manifiestan por la sobreproducción de leucocitos (glóbulos blancos), las eritroleucemias: sobreproducción de eritrocitos (glóbulos rojos) y trombocitosis que consiste en la sobreproducción de plaquetas; b) trastornos linfoproliferativos ó linfomas: cáncer del tejido linfático: nódulos linfáticos, bazo, timo e hígado (Vega, 1985).

El cáncer es una enfermedad que ocupa un lugar importante en América (cuadros 1 y 2) y en México es la segunda causa de muertes anualmente (Archivo Estadístico del Instituto Nacional de Cancerología, 1986).

Debido a la alta incidencia del cáncer la investigación acerca de posibles agentes que puedan combatirlo se ha ido incrementando.

En una amplia reseña histórica que realizó Pratt y Ruddon en 1979 menciona que el primer compuesto efectivo contra el cáncer fué la mostaza nitrogenada, cuyo precursor es la mostaza sulfúrica. En 1931, Adair y Bagg aplicaron mostaza sulfúrica al carcinoma escamoso y también inyectaron este compuesto directamente a tumores humanos, pero el compuesto fué considerado demasiado tóxico para su uso.

Gilman y sus colegas examinaron el efecto antitumoral de la mostaza nitrogenada sobre linfosarcoma de ratón encontrándose respuesta positiva, y en 1942, Gilman, Godman, Lindsog y Dougherty comenzaron el primer tratamiento clínico con mostaza nitrogenada en pacientes con linfosarcoma. Una de las mostazas nitrogenadas que se demostró tiene efecto clínico positivo es la HN₂ o mecloretamina que todavía es utilizada como una droga anticancerígena además de una serie de agentes alquilantes recientemente sintetizados como una extensión del compuesto

original (Pratt y Ruddon, 1979).

En general, las drogas anticancerígenas son más útiles contra tumores malignos con una alta tasa de células en división. En términos prácticos, las drogas por sí solas son primordialmente efectivas contra leucemias y linfomas. Los tumores "sólidos" incluyendo aquellos del colon, recto, pulmón y mama, usualmente tienen una baja tasa de células en división y por lo tanto son menos susceptibles al tratamiento por drogas. Por esta misma razón estos tumores son preferentemente tratados con cirugía y con agentes químicos y en ocasiones se emplea únicamente la cirugía. La cirugía y la radioterapia pueden erradicar frecuentemente tumores primarios o localizados, pero suelen fallar cuando el cáncer ha emigrado a otras áreas del cuerpo. En tales casos, la quimioterapia puede llegar a eliminar la enfermedad metastásica (Pratt y Ruddon, 1979).

Los compuestos de los que se considera pueden tener actividad anticancerígena son evaluados en pruebas *in vivo* en mamíferos (principalmente rata y ratón) e *in vitro* en células derivadas del cáncer humano (Carter y Livingston, 1976) (los bioensayos más utilizados se muestran en el cuadro 3).

En la actualidad se pueden clasificar a las sustancias que se utilizan en la quimioterapia del cáncer en las siguientes clases: a) agentes alquilantes, b) antimetabolitos, c) hormonas, d) enzimas, e) antibióticos y f) productos extraídos de las plantas (Stock, 1960; Hellman, 1972 y Pratt y Ruddon, 1979).

a) Agentes alquilantes.

La mayoría de los agentes alquilantes efectivos son bi- o trifuncionales. Estos agentes tienen la capacidad de actuar a temperatura corporal y en condiciones acuosas neutrales, su forma de acción es mediante la interacción con la información genética de la célula, es decir alquilan el DNA. Se encontró que la actividad biológica de los grupos alquilantes está determinada no solo por su reactividad química, sino también por la naturaleza de la estructura transportadora; así, los compuestos con similar reactividad química pueden ser asociados a un amplio espectro de efectos antitumorales, por esta razón algunos aminoácidos, péptidos, carbohidratos, esteroides y varios compuestos heterocíclicos han sido utilizados como acarreadores. En este grupo caen importantes compuestos como las mostazas nitrogenadas, etilenaminas, o etilenamidas, epóxidos y metanosulfonatos.

Algunos compuestos que se encuentran dentro de este grupo reaccionan directamente después de que ellos son introducidos al cuerpo. También existen compuestos que son inicialmente inactivos pero que son activados de manera selectiva dentro del tumor. Uno de los compuestos más ampliamente usados como anticancerígeno es la ciclofosfamida, la cual es un compuesto que necesita ser

activado por las enzimas hepáticas (Stock, 1960 y Pratt y Ruddon, 1979).

b) Antimetabolitos.

El término "antimetabolito" se emplea para designar compuestos con una estructura molecular semejante a los metabolitos de la célula, pero que interfieren con las funciones de estos últimos (Stock, 1960). Estos son básicamente de tres tipos: antifolatos, antipurinas y antipirimidinas.

El primer antifolato en ser empleado clínicamente fue la aminopterina. En 1947, Farber suministró la aminopterina a 16 niños con leucemia aguda, una remisión dramática aunque temporal se notó en 10 de los 16 niños. En 1949, Seeger y sus colegas sintetizaron la aminopterina (metotrexate) que se usó en clínica de inmediato y aún se emplea en la actualidad aunque con ciertas precauciones debidas a su toxicidad (Pratt y Ruddon, 1979).

Dentro de las antipurinas se encuentra la 6-mercapto purina, que se emplea en el tratamiento de la leucemia aguda infantil.

Las aminopterinas se sintetizaron en un intento por encontrar análogos que pudieran inhibir el uso de uracilo por los tumores. Heidelberg y colaboradores razonaron que un antimetabolito semejante al uracilo podría ser utilizado preferencialmente por los tumores y por lo tanto podría inhibir específicamente su crecimiento. Así surgió la primer antipirimidina clínicamente efectiva, la 5-fluorouracilo a la cual le han seguido otras. El más prominente de estos análogos es la citosina arabinosa, la cual es utilizada ampliamente como antileucémico (Stock, 1960 y Pratt y Ruddon, 1979).

c) Hormonas.

Tumores que surgen en tejidos normalmente susceptibles al medio hormonal tienden a responder al tratamiento con hormonas, especialmente en los estadios tempranos de desarrollo del tumor. Clínicamente los principales ejemplos son el cáncer de mama, el de endometrio y el cáncer de prostata. Por ejemplo, en mujeres premenopáusicas con cáncer de mama diseminado, los andrógenos (e. g. propionato de testosterona) son comúnmente administrados debido a su acción antiestrogénica (Stock, 1960).

d) Enzimas.

En 1953 Kidd reportó que el suero de cuyos causaba la regresión o inhibición de ciertos tipos de linfomas de rata y ratón. El material activo fue la L-asparaginasa. Esta enzima es producida actualmente en gran escala a partir de fuentes bacterianas, principalmente *Escherichia coli*, y es útil

clínicamente en el tratamiento de leucemia aguda. Esta actividad parece ser debida a la destrucción de la asparagina, dado que algunos tumores requieren de asparagina, mientras que su contraparte normal no. Los experimentos con animales de laboratorio indican que son poco tóxicas, selectivas e inocuas, pero también se ha observado la aparición de resistencia a la droga (Stock, 1960; Hellman, 1972 y Pratt y Ruddon, 1979).

e) Antibióticos.

En 1954, Faber utilizó a la actinomicina D, un antibiótico citotóxico aislado de *Streptomyces* sp para tratar el tumor de Wilm en niños. El demostró la efectividad de la actinomicina D conduciendo al desarrollo de una gran cantidad de antibióticos con actividad anticancerígena en roedores y en humanos. Los antibióticos antitumorales difieren de los antibióticos utilizados contra las bacterias en que los primeros son marcadamente citotóxicos para las células de mamíferos. Los antibióticos clínicamente efectivos incluyen: la mitomicina contra leucemia mieloide; mitramicina contra tumores testiculares; bleomicina contra tumores escamosos y linfomas; daunorubicina contra leucemias y una gran variedad de tumores sólidos, incluyendo carcinomas y sarcomas. Los antibióticos actúan en un punto específico del ciclo celular (metafase) pero muestran múltiples efectos bioquímicos los cuales incluyen la interferencia con la síntesis de RNA y DNA. (Stock 1960 y Pratt y Ruddon, 1979).

f) Productos extraídos de plantas.

El mirto ha sido utilizado en la medicina tradicional por siglos y en la década de los 50's llamó la atención por su probable efecto hipoglucémico. Cutts *et al.*, en 1957 observaron que el azúcar en la sangre no declinaba con la presencia de éstos alcaloides; sin embargo el número de leucocitos sí lo hacía. Johnson y colaboradores demostraron en 1957 que las fracciones de alcaloides extraídos de esta planta tenían propiedades antileucémicas en ratón (Pratt y Ruddon, 1979). *Vinca rosea* (*Catharanthus roseus* Linn) comúnmente denominada mirto, es originaria de las Indias Occidentales. A partir de investigaciones independientes en EUA y Canadá se aislaron los principios activos de esta planta obteniéndose la vincristina (VCR) y la vinblastina (VBL). El mecanismo de acción propuesto para estos alcaloides postula al menos dos sitios activos diferentes, el primero como inhibidor de la mitosis (efecto reversible) a través de la unión de la droga a precursores citoplasmáticos del huso mitótico (es decir, con la tubulina) y el segundo es la inhibición de la síntesis de RNA por medio de una interacción con la RNA polimerasa (Carter y Livingston 1976 y Pratt y Ruddon, 1979). Actualmente la vinblastina y la vincristina juegan un papel importante en el tratamiento de leucemias, linfomas, cáncer de mama y melanoma maligno (Carter y

Livingston 1976).

A partir de entonces la búsqueda de agentes anticancerígenos en extractos de plantas ha continuado y son numerosos los principios activos que han demostrado tener actividad antitumoral (Kupchan, 1974). Los agentes anticancerígenos extraídos de las plantas pueden ser clasificados en: taninas, esteroides, quinonas y terpenos, lignanos, flavonoides, saponinas, lactonas esteroidales, quasinoles, ansamacrolidas, proteínas y alcaloides (Hartwell, 1976).

Algunos ejemplos de estas investigaciones son los efectos positivos de la sesbanina (un alcaloide extraído de *Sesbania drummondii* (Rydb) contra la leucemia linfocítica P-388, (Powell y Smith 1981), el fisalin-B es activo contra células tumorales 9KB y 9PS *in vivo* e *in vitro*, este principio se obtiene a partir de *Witheringia coccoloboides* (Dammer) (Antoun *et al.*, 1981). La faragonina, principio activo extraído de *Fagara zanthoxyloides* (Lam) ha mostrado ser activa contra la leucemia linfocítica P-388 y la leucemia linfocítica L-1210 (Arisawa *et al.*, 1984), el metaxilanicresinol, laricerresinol y siringaresinol son principios activos aislados de *Mikstroemia elliptica* que han sido efectivos contra la leucemia linfocítica P-388 *in vitro* (Duh *et al.*, 1986), y por último la partenolida, principio activo extraído de *Paramichelia baillonii* ha mostrado ser efectivo contra el carcinoma de nasofaringe humano *in vitro* (Ruangrunsi y Rivepihoon, 1987) y numerosos ejemplos más pueden ser citados (cuadro 4).

En años recientes el Instituto de Química de la UNAM ha obtenido diversos extractos de plantas mexicanas. En particular el Laboratorio dirigido por la Dra. Rodríguez-Hahn ha obtenido extractos de interés (la nemorona y la desmetil-fruticulina) por su semejanza química estructural con la taxodiona y taxodona dos metidas quinonas diterpenos extraídos de *Taxodium distichum* (Taxidaceae). Se ha demostrado que estos compuestos tienen efectos positivos contra el carcinosarcoma de Walker *in vivo* en ratas e *in vitro* contra el carcinoma de nasofaringe en humano (KB) (Kupchan *et al.*, 1968 y 1969).

La nemorona y la fruticulina son obtenidas a partir de plantas del género *Salvia*. Este, constituye el género más numeroso de la familia Labiateae con 900 especies distribuidas en todo el mundo (Stanley *et al.* 1973 *apud* Galicia *et al.*, 1987). Este género ha sido subdividido en cuatro subgéneros: *Scalera*, *Salvia*, *Leonia* y *Calosphace*. La mayoría de las especies americanas pertenecen al subgénero *Calosphace* el cual está representado en México por alrededor de 300 especies (Ramamoorthy, 1984).

La nemorona fué extraída por primera vez por Romanova en 1971 en la URSS, en tanto que la fruticulina se extrajo y caracterizó

en México en 1986 (Rodríguez-Hahn *et al.*, 1986).

La nemorona es extraída de las partes aéreas de *Salvia pubescens* clasificada en la sección Erythrostachys del subgénero *Calosphace*; por su parte la desmetil-fruticulina es obtenida de *Salvia fruticulosa* que pertenece a la sección Tomentallae del mismo subgénero (Stanley *et al.* 1973 *apud* Galicia *et al.*, 1987).

La desmetil-fruticulina es una quinona diterpeno cuya fórmula es $C_{20}H_{20}O_4$. Este compuesto se derivó a partir de la fruticulina A, la cual muestra la presencia de un grupo isopropil unido a un anillo de benzoquinona y un grupo metil aromático unido a un grupo metoxi y dos protones aromáticos (Rodríguez-Hahn *et al.*, en prensa). La nemorona cuya fórmula es $C_{22}H_{20}O_4$ es una alfa-hidroxiquinona unida a un anillo abietano (Galicia *et al.*, 1987) (cuadro 5).

Como ya se ha mencionado, los principales sistemas para evaluar el efecto de los posibles anticancerígenos *in vivo* son los bioensayos en rata y ratón e *in vitro* el cultivo de células extraídas de cánceres humanos, sin embargo la infraestructura requerida y el alto costo de estos sistemas conduce a que en muchos casos los estudios queden en la extracción, purificación y caracterización de posibles agentes anticancerígenos. Por otra parte se ha demostrado que la mayoría de los cancerígenos son mutagénicos en diversos sistemas de prueba (cuadro 8). Por ejemplo mutágenos químicos tales como los agentes alquilantes y los antimetabolitos de ácidos nucleicos, muestran un efecto mutagénico "estable" (i. e. no influenciado por alteraciones internas o condiciones ambientales) en una gran variedad de sistemas de prueba. Algunas mutaciones pueden conducir a que la célula se detenga en una fase del ciclo celular y esto es precisamente el efecto citostático en la quimioterapia del cáncer (evitar la proliferación celular) (Vogel y Rohrbörn, 1970). Es por esto que algunos compuestos que son considerados cancerígenos a través de la inducción de mutaciones, pueden ser utilizados contra el cáncer dependiendo de la concentración y ruta de administración. Es decir, los sistemas de prueba de mutagénesis pueden ser útiles en la detección de posibles compuestos anticancerígenos, además a través de ellos es posible conocer el espectro total de alteraciones genéticas (genotóxicas) que son capaces de inducir estos agentes. Estos sistemas van desde bacterias hasta mamíferos (cuadro 6).

Para un primer acercamiento hacia el conocimiento de la capacidad mutagénica de un compuesto generalmente se emplea el sistema de bacterias, éste es rápido y eficiente en detectar mutaciones génicas (Ames *et al.*, 1973); sin embargo no toma en cuenta la estructura básicamente diferente de los eucariontes (es decir el arreglo del material genético (ADN) en cromosomas asociado a histonas dentro de un núcleo y los ciclos de división que incluyen procesos mitóticos y meióticos), además del hecho de

que algunos compuestos requieren ser activados por enzimas microsomales presentes en el hígado de mamíferos y otros órganos (Vogel y Sobels, 1976), por lo que este sistema requiere activación exógena.

Las levaduras también son capaces de detectar daño genético particularmente mutaciones puntuales, recombinación mitótica y aneuploidia mitótica, así como efectos meióticos con respecto a la inducción de mutación y segregación anormal de los cromosomas (Zimmermann *et al.*, 1984). *Saccharomyces cerevisiae* posee el sistema de citocromos P450 el cual es capaz de activar una gran cantidad de promutágenos sin la necesidad de activación exógena adicional, sin embargo al igual que en el caso de las bacterias se recomienda la activación con la fracción S-9 del hígado de mamíferos. Para ambos sistemas la activación exógena se puede llevar a cabo por alguno de los siguientes pasos: a) el empleo de homogenados celulares que contienen las enzimas microsomales provenientes fundamentalmente del hígado de roedores (rata o criceto) que ejercen su acción *in vitro* sobre los compuestos, b) la utilización de fluidos corporales, como orina y sangre de individuos (animales de laboratorio o humanos) expuestos *in vivo* a los agentes químicos, c) el ensayo *via* el hospedero, en el que los microorganismos se introducen en un ratón (en el peritoneo o en la sangre) al que se administra la sustancia en estudio (Maron y Ames, 1983 y Zimmermann *et al.*, 1984).

Las plantas también han demostrado ser útiles en el estudio de la inducción de mutaciones. Así, con *Tradescantia paludosa* se pueden detectar mutaciones somáticas y la inducción de micronúcleos, la vía de administración en este sistema es principalmente gaseosa, por lo que es considerado por varios autores como el mejor sistema para monitoreo ambiental (Sparrow *et al.*, 1974 y Ma, 1979). Por su parte *Vicia faba* facilita ampliamente el estudio de daño citogenético tal como la inducción de aberraciones cromosómicas y el intercambio entre cromátidas hermanas, debido a su número cromosómico reducido y al gran tamaño de los mismos (una célula de la raíz apical de *Vicia* contiene aproximadamente 46 pg de DNA el cual esta distribuido en 12 cromosomas, una célula de criceto tiene aproximadamente 8.3 pg de DNA distribuido en 22 cromosomas y una célula humana tiene alrededor de 7.3 pg de DNA distribuidos en 46 cromosomas) (Khilman, 1975), sin embargo las plantas tienen un metabolismo básicamente diferente al de los mamíferos y esto constituye una gran desventaja de este sistema.

Por otra parte el sistema de mamíferos es esencial en el estudio del daño genético inducido para la determinación del riesgo genético de la población humana expuesta. Estos estudios se pueden realizar *in vivo* o *in vitro*; sin embargo en pruebas de monitoreo y pruebas toxicológicas el número de animales es reducido (Russel y Matter, 1980) y en algunas pruebas el costo se eleva debido a la necesidad de un bioterio (Cortinas de Nava *et*

al., 1977).

Drosophila melanogaster ofrece numerosas ventajas, las cuales la hacen el sistema de prueba animal más rápido, versátil y eficiente (Zimmering, 1975). En primer lugar, es el eucarionte mejor conocido genéticamente, con el cual se pueden realizar estudios *in vivo* e *in vitro* (Zimmering, 1976). Posee cuatro cromosomas, uno de los cuales es muy pequeño, lo que facilita enormemente los experimentos.

Otra ventaja es que su mantenimiento es relativamente económico y en espacios reducidos pueden obtenerse poblaciones grandes. El ciclo de vida es corto por lo que se dispone de varias generaciones en un breve periodo de tiempo. El ciclo de vida se completa en 10 días a 25°C, las etapas y la duración de cada una son las siguientes: huevo (un día), larva de primer estadio (un día), larva de segundo estadio (un día), larva de tercer estadio (dos días), prepupa (cuatro horas), y pupa (cuatro días y medio) (fig. 1) (Demerec, 1965 y Zimmering, 1976). Además se conoce el tiempo de su gametogénesis lo que permite evaluar cada una de las etapas de la espermatogénesis y tratar estados premeióticos, meióticos y postmeióticos y por lo mismo detectar la existencia de una sensibilidad diferencial entre los diferentes tipos de células de la línea germinal y saber si el compuesto actúa de forma directa o indirecta, ya que en las distintas etapas de la espermatogénesis la actividad del retículo endoplasmático (R.E.) es sensiblemente diferente, lo que se refleja en una actividad metabólica desigual. Así, en los estados de espermatocito secundario y espermátida temprana, la actividad del R.E. es particularmente importante, en tanto que se ha observado la ausencia de ésta en espermátida tardía y espermatozoide. De esta forma, si el compuesto actúa en forma directa y por lo tanto no requiere activación metabólica, lo podemos detectar en espermátida tardía y espermatozoide; y si la requiere se recupera su efecto en espermátida temprana y espermatocito secundario, clasificándose al compuesto como indirecto (Chandley y Bateman, 1962 y Vogel y Sobels, 1976).

La detección de daño genético inducido por mutágenos que actúan de forma indirecta es posible gracias a la presencia de un paquete enzimático en el retículo endoplasmático muy semejante a la fracción microsómica S-9 del hígado de mamíferos la cual es capaz de activar y/o desactivar promutágenos que requieren activación metabólica (Zimmering, 1975; Vogel y Sobels, 1976; Baars et al., 1980; Hallstrom et al., 1982 y Zijlstra, 1984).

La ruta de exposición de *Drosophila* a los agentes químicos puede realizarse por diversas vías: alimentación (de larvas o adultos), inyección (adultos) o inhalación (de larvas o adultos). Aunque el método de exposición debe ser elegido de acuerdo a la naturaleza del compuesto y el objetivo del experimento, se pueden seguir ciertas pautas generales. Por ejemplo, si el compuesto

tiene una vida media corta en solución, se recomienda se administre por la vía de inyección, la alimentación se usa cuando el compuesto es estable en solución o cuando es insoluble en los solventes comunes (orgánicos e inorgánicos) y se utiliza un saponificador que puede mantener al compuesto en suspensión, o bien si es la ruta por la cual el hombre tiene acceso al compuesto, finalmente la inhalación es recomendable cuando el material a probar se volatiliza, ésta ruta presenta la ventaja de que el compuesto llega directamente a las gónadas (Zimmering, 1975; Vogel y Sobels, 1976 y Valencia et al., 1984).

La investigación acerca del uso de *Drosophila melanogaster* en el estudio de la inducción de mutaciones comenzó en 1927, cuando H.J. Muller desarrolló el método ClB para valorar la inducción de letales recesivos ligados al sexo y lo utilizó para demostrar que los rayos X son capaces de inducir este tipo de daño. A partir de entonces se han implementado un gran número de sistemas de cruce con marcadores genéticos especiales, inversiones, translocaciones y otros rearrreglos cromosómicos que le confieren al sistema una gran versatilidad para detectar un amplio rango de alteraciones genéticas inducidas (Zimmering, 1975; Environmental Mutagen Society, 1975 y Valencia et al., 1984). Dentro de éstas se encuentran la inducción de aberraciones cromosómicas empleando las glándulas salivales o el ganglio neural de la larva (Gatti et al., 1974); análisis de mutaciones puntuales mediante la prueba de letales recesivos ligados al sexo (SLRL) (Zimmering, 1976 y Lee et al., 1983); inducción de letales dominantes (Zimmering, 1976); translocaciones cromosómicas; pérdida parcial y total de cromosomas sexuales (SCLT) (Zimmering, 1975 y Valencia, et al., 1984); valoración del efecto teratogénico y carcinogénico (Schuler et al., 1982); mutación y recombinación somática (SMART) (Graff et al., 1983 y 1984).

Estas alteraciones genéticas se evalúan analizando el fenotipo resultante de los cambios genéticos heredables inducidos (Kilbey et al., 1981 y Valencia et al., 1984).

En el presente trabajo se valorará el efecto genético de la desmetil-fruticulina y de la nemorona así como de sus metabolitos secundarios sobre la pérdida parcial o total de cromosomas sexuales de *Drosophila melanogaster*, empleando el sistema de camadas.

METODOLOGIA.

Descripción de la prueba.

Los cromosomas de ambos progenitores se marcan con mutaciones reconocibles fenotípicamente, de tal forma que los cromosomas o sus partes son identificables en la siguiente generación (F_1).

Se emplea un cromosoma Y compuesto que presenta los alelos y^+ y B^a en los brazos corto y largo respectivamente. Como se puede ver en el cuadro 7 y de acuerdo al sistema de cruzas que se describe a continuación se pueden seguir los siguientes eventos genéticos: pérdida del alelo silvestre de "yellow" (y^+); pérdida del alelo "Barra de Stone" (B^a); pérdida de ambos marcadores (y^+ , B^a); no disyunción en hembras, no disyunción en machos e intercambios X:Y.

Sistema de Cruzas.

Se empleó el sistema de cruzas de hembras y^{2w^a}/y^{2w^a} y machos y/B^aYy^+ .

Las hembras de la línea y^{2w^a}/y^{2w^a} presentan dos marcadores fenotípicos en sus cromosomas X: el alelo "yellow 2" (y^2 , I:0.0) el cual es recesivo y produce cuerpo amarillo con cerdas y pelos negros y el alelo "white apricot" (w^a , I:1.5) que también es recesivo y produce el fenotipo de ojos color durazno.

Los machos de la línea y/B^aYy^+ , presentan en el cromosoma X el marcador "yellow" (y , I:0.0) que es recesivo y produce el fenotipo de cuerpo amarillo con pelos y cerdas café. El cromosoma Y presenta insertados dos fragmentos del cromosoma X localizados uno en el brazo corto y otro en el brazo largo. En el brazo largo se encuentra el alelo "Barra de Stone" que es dominante obteniéndose un fenotipo de ojos reducidos a una barra. El brazo corto tiene insertado el alelo silvestre de "yellow" (y^+), este impide la expresión del alelo recesivo "yellow" portado en el cromosoma X, por lo tanto el macho fenotípicamente presenta ojos de color rojo reducidos a una barra y cuerpo silvestre (Lindsley y Grell, 1968).

Químico.

La desmetil-fruticulina y la nemorona, fueron proporcionados por el Instituto de Química de la UNAM.

Vía de administración.

La desmetil-fruticulina se administró por la ruta de alimentación e inyección, en tanto que la nemorona se administró solo por alimentación. En ambos casos se utilizaron machos de no más de 48 horas de edad. La inyección se llevó a cabo en la

región latero-ventral en el tercer segmento abdominal de la mosca. Se utilizaron microjeringas que se elaboraron estirando una pipeta pasteur por su parte más fina, con ayuda de un mechero; para suministrar la solución se empleó un bulbo de goma que se colocó en el extremo superior de la jeringa. Para el caso de la alimentación los machos fueron colocados en viales con papel filtro embebido en la suspensión donde permanecieron durante 24 horas (25 machos por vial). Después del tratamiento los machos se transfirieron a medio de cultivo nuevo con hembras de no más de 72 horas de edad en una proporción 3:1 (tres hembras por cada macho tratado).

Procedimiento experimental.

En la concentración más alta alcanzada por la disolución de ambos compuestos ya sea con dimetilsulfóxido (DMSO) ó con Tween 80 (Index Merck, 1983) no se mostró toxicidad alguna en los machos tratados, por lo que no se pudo obtener ningún valor de dosis letal (LD).

La solución inyectable de desmetil-fruticulina se preparó utilizando como vehículo DMSO al 5%. Se probaron las siguientes concentraciones 10, 50 y 100ppm, el testigo en este caso fué DMSO al 5%. La disolución del compuesto para la alimentación tanto para desmetil-fruticulina como para nemorona se llevo a cabo suspendiendo el compuesto en Tween 80 y sacarosa al 5%, y permaneciendo en agitación durante 1 hora con el fin de obtener una mezcla homogénea. Se probaron las siguientes concentraciones de desmetil-fruticulina y nemorona 1000, 2500 y 5000ppm, el testigo fué sacarosa al 5% (0.1ml) en Tween 80 (0.9ml).

Se trataron 100 machos por concentración y 100 para el testigo.

Sistema de camadas

Con el fin de evaluar el daño genético inducido en los distintos estadios germinales se utilizó el sistema de camadas; éste consiste en evaluar los estadios de la espermatogénesis: espermatozoide, espermátida y espermatocono. La camada A, abarca del día 0 al día 2 y es en la que se evalúa espermatozoide, la B que va del día 3 al 5 evalúa espermátida y la camada C que va del día 6 al 9 espermatocono. Esto se hace empleando una cruce masiva en la que se sigue una proporción 3:1 (tres hembras por un macho) e incluye la transferencia repetida de los machos a un medio de cultivo nuevo con hembras vírgenes.

Se colocaron 25 machos tratados por frasco a los que se les cruzó con 75 hembras haciendo un total de 4 frascos por cada concentración y el testigo. Después de dos días se transfirieron los machos a medio de cultivo nuevo y se cruzan con otras 75 hembras vírgenes y finalmente se hace otra transferencia a los 3

días.

Medio de cultivo.

El medio de cultivo empleado consiste de 12 g de agar (Merck), 20 g de dextrosa (Merck), 26 g de azúcar, 50 g de harina de maíz, 12 g de levadura de cerveza disuelta en 160 ml de agua,

y como agentes para evitar la contaminación por hongos y bacterias se usaron 4 ml de nipagin al 10% en alcohol etílico (Merck) y 4 ml de ácido propiónico (Merck).

Procedimiento estadístico.

La evaluación estadística de los resultados se realizó por medio de las tablas de Kastenbaum-Bowman (1970). Se utilizó un nivel de significancia del 5%, con el fin de establecer si los compuestos inducen algún efecto clastogénico y/o no disyuncional ó si las diferencias encontradas respecto al testigo son debidas al azar.

RESULTADOS.

Para la evaluación del efecto de la nemorona y la desmetilfruticulina se analizó el fenotipo de cada individuo F_1 proveniente de la cruce de machos tratados y^2w^+/y^2w^+ por hembras y^2w^+/y^2w^+ .

Esta determinación se realizó para los cuatro experimentos, y su repetición, los resultados de ambos se sumaron pues no existían diferencias significativas entre ellos ($P < 0.05$).

En la tabla I se muestran los resultados obtenidos al inyectar machos con distintas concentraciones de desmetilfruticulina, en las camadas A, B y C por separado. Para la camada A, que comprende desde el primer día del tratamiento hasta el día dos, se observa que la frecuencia de hembras XXY para el testigo es de 0.04%, habiendo un ligero incremento en las concentraciones de 10 ppm (0.07%) y 50 ppm (0.11%) siendo en ambos casos no significativo. La frecuencia de machos aneuploides en el testigo (0.15%) es mayor que en cualquiera de las concentraciones utilizadas, en 10 ppm fue de 0.11%, en 50 ppm de 0.03% y en 100 ppm de 0.04%. No se presentaron pérdidas parciales ni en el testigo ni en ninguna de las concentraciones.

En la camada B no se presentan hembras XXY en el testigo ni en 50 ppm, hallándose una frecuencia de 0.07% en 10 ppm y 0.04% en 100 ppm, no siendo este aumento significativo. Respecto a los machos aneuploides la frecuencia que se observa para el testigo es de 0.03%, encontrándose un ligero aumento en la concentración de 50 ppm (0.15%) y en 100 ppm (0.07%), en ninguno de los dos casos éste es significativo. En esta camada no se encuentran pérdidas parciales.

En la camada C el testigo presenta una frecuencia de 0.05% para las hembras XXY, dándose esta misma frecuencia en la concentración de 10 ppm, en tanto que la de 50 ppm presenta una frecuencia de 0.04%, no hay diferencias significativas en ambos casos. Respecto a los machos aneuploides las frecuencias son las siguientes: el testigo presenta una frecuencia de 0.10%, la concentración de 50 ppm una de 0.09% y 100 ppm una de 0.05% no hallándose diferencias significativas en las concentraciones respecto al testigo.

En la tabla II se muestran los resultados obtenidos al alimentar machos progenitores con distintas concentraciones de desmetilfruticulina, en las camadas A, B y C por separado. Para la camada A, con respecto a las hembras XXY el testigo presenta una frecuencia de 0.04%, en tanto que en las concentraciones se presenta una frecuencia muy similar siendo: 0.05% en 1000 ppm, 0.04% en 2500 ppm y en 5000 ppm, no hay diferencias significativas respecto al testigo. En el caso de los machos aneuploides, éstos no se presentan en el testigo, en 1000 ppm su

frecuencia es de 0.02% y en 2500 es de 0.08%, no habiendo diferencias significativas respecto al testigo. En el caso de las pérdidas parciales éstas no se presentan en el testigo, y su frecuencia es 0.04% en 2500 ppm para la pérdida del marcador B^m; no siendo significativa esta diferencia.

En la camada B, no se presentan hembras XXY, ni en el testigo ni en ninguna de las concentraciones. Respecto a los machos aneuploides, éstos no se presentan en el testigo, en tanto que en 2500 ppm su frecuencia es de 0.11% y en 5000 ppm es de 0.04%, ambas son no significativas respecto al testigo. No se encontraron pérdidas parciales en esta camada.

En la camada C, se observa que el testigo no presenta hembras XXY, en tanto que la frecuencia de éstas en 5000 ppm es de 0.09%, no existiendo una diferencia significativa respecto al testigo. Respecto a los machos aneuploides el testigo presenta una frecuencia de 0.04% y hay un ligero incremento en 1000 y 2500 ppm, siendo sus frecuencias 0.08% y 0.09% respectivamente, la concentración de 5000 ppm presenta una frecuencia igual a la del testigo; en ninguno de los tres casos hubo una diferencia significativa. En el caso de las pérdidas parciales éstas no se presentan en el testigo y en 5000 ppm hay una frecuencia de 0.04% para la pérdida del marcador B^m.

En la tabla III se muestran los resultados obtenidos al alimentar machos progenitores con desmetil-fruticulina al 1% (10 000 ppm), en las camadas A, B y C por separado. En la camada A, se observa que el testigo presenta una frecuencia de hembras XXY de 0.06%, esta misma frecuencia la tiene en el caso de los machos aneuploides, en la concentración de 1% no se observaron hembras XXY ni machos aneuploides. No se presentan ninguno de los eventos de pérdidas parciales, ni en el testigo, ni en la concentración probada.

En la camada B, la frecuencia de hembras XXY en el testigo es de 0.05% y la de machos aneuploides de 0.09%, en la concentración probada no se encontraron ninguno de estos eventos. En esta camada tampoco se presentaron pérdidas parciales.

Respecto a la camada C, el testigo presenta una frecuencia de hembras XXY de 0.06%, en tanto que no se registraron el resto de los eventos, ya sea en el testigo o en desmetil-fruticulina al 1%.

En la tabla IV se muestran los resultados obtenidos al alimentar machos progenitores con distintas concentraciones de nemorona, en las camadas A, B y C, por separado. Para la camada A, el testigo no presenta hembras XXY, en tanto que en la concentración de 1000 ppm, su frecuencia es de 0.03% y en 5000 ppm es de 0.07%, en ambos casos las diferencias no son significativas respecto al testigo, respecto a los machos

aneuploides el testigo presenta una frecuencia de 0.07%, la misma que esta presente en las concentraciones de 1000 y 2500 ppm, no hay diferencias significativas. En las pérdidas parciales, para la pérdida del marcador B^m en el testigo no se observó su presencia, en tanto que en 1000 ppm, la frecuencia es de 0.03%, y en 5000 ppm es de 0.07% en ambos casos no existen diferencias significativas.

Para la camada B, el testigo no presenta hembras XXY, en tanto que la frecuencia de las mismas en 2500 ppm es de 0.14% y en 5000 ppm, es de 0.04% en ambos casos no existen diferencias significativas respecto al testigo. En lo que se refiere a la presencia de machos aneuploides, el testigo muestra una frecuencia de 0.04%, misma que se presenta en 5000 ppm. en tanto que en 1000 ppm hay un ligero incremento siendo la frecuencia de 0.08%, en ningún caso hay diferencias significativas. Con respecto a las pérdidas parciales éstas no se presentan en el testigo, ni en ninguna de las concentraciones a excepción de 5000 ppm, en la que la frecuencia de machos w^m y machos y²w^mB^m es de 0.04%, no habiendo diferencias significativas respecto al testigo.

En la camada C, solo la concentración de 1000 ppm presenta hembras XXY, con una frecuencia de 0.04%, no hay diferencias significativas respecto al testigo. En el caso de los machos aneuploides el testigo presenta una frecuencia de 0.06%, misma que presenta la concentración de 2500 ppm, en tanto que en la de 5000 ppm, su frecuencia es de 0.05%, existiendo un ligero aumento en 1000 ppm, donde la frecuencia de estas hembras es de 0.14%, no habiendo diferencias significativas respecto al testigo. Con respecto a las pérdidas parciales solo se presentan machos en 1000 y 5000 ppm, siendo las frecuencias de 0.04 y 0.10% respectivamente, no existiendo diferencias significativas respecto al testigo.

En la tabla V se muestran los resultados obtenidos al inyectar machos con las distintas concentraciones de desmetilfruticulina, en las camadas A, B, C y la suma de éstas por concentración y el testigo. En el testigo se observa que la frecuencia de hembras XXY, es de 0.03%, en tanto que hay un ligero incremento de ésta en 10 y 50 ppm, siendo las frecuencias de 0.06 y 0.10% respectivamente, y una ligera disminución en 100 ppm donde la frecuencia de este tipo de hembras es de 0.01, en ninguno de estos casos hay diferencias significativas respecto al testigo. Por lo que se refiere a los machos aneuploides, el testigo tiene una frecuencia de 0.09%, misma que se presenta en la concentración de 50 ppm, habiendo un ligero descenso de la misma en 10 y 100 ppm, donde las frecuencias son de 0.03 y 0.05%, respectivamente, no existiendo diferencias significativas respecto al testigo. En lo que se refiere a las pérdidas parciales, éstas no se presentan en ninguna concentración, ni en el testigo.

En la tabla VI se muestran los resultados obtenidos al alimentar machos progenitores con distintas concentraciones de desmetil-fruticulina, en las camadas A, B, C y la suma de éstas por concentración y el testigo. La frecuencia de hembras XXY en el testigo es de 0.01%, esta misma frecuencia se presenta en las concentraciones de 1000 y 2500 ppm, en tanto que en 5000 ppm, se nota un ligero incremento a 0.04%, en ninguna de las tres concentraciones existe una diferencia significativa respecto al

testigo. Con respecto a los machos aneuploides, el testigo muestra una frecuencia de 0.01%; en 5000 ppm, se nota un ligero incremento siendo la frecuencia de 0.03%, en 1000 ppm también hay un ligero incremento (0.08%), y finalmente en 2500 ppm se presenta un incremento más notorio dándose una frecuencia de 0.10%; sin embargo no se encuentran diferencias significativas en ninguna de las concentraciones. Con respecto a las pérdidas parciales, éstas no se presentan en el grupo testigo, en tanto que en 2500 y 5000 ppm la frecuencia de machos w^e es de 0.01%, no existiendo diferencias significativas respecto al testigo.

En la tabla VII se muestran los resultados obtenidos al alimentar machos progenitores con desmetil-fruticulina al 1%, en las camadas A, B y C, y la suma de éstas por concentración y el testigo. En el testigo se observa una frecuencia de 0.05% para las hembras XXY y para los machos XO, en la concentración de 1% no se registran ninguno de los dos eventos.

En la tabla VIII se muestran los resultados obtenidos al alimentar machos progenitores con distintas concentraciones de nemorona, en las camadas A, B y C, y la suma de éstas por concentración y el testigo. El testigo no presenta hembras XXY, en tanto que en 1000 ppm, se registra una frecuencia de 0.03%, y en 2500 y 5000 ppm se presenta una frecuencia de 0.04%, no habiendo diferencias significativas respecto al testigo. En lo que se refiere a los machos XO, el testigo presenta una frecuencia de 0.05%, notándose un ligero aumento en 1000 ppm, siendo la frecuencia de 0.09%, en tanto que hay una ligera disminución en 2500 y 5000 ppm, siendo las frecuencias de 0.4% y 0.03%, respectivamente; no hay diferencias significativas.

En resumen, se puede decir que tanto para la desmetil-fruticulina como para la nemorona, con las distintas concentraciones y rutas de administración utilizadas (en las camadas A, B y C) de los experimentos realizados en el presente estudio las fluctuaciones de las frecuencias observadas son debidas al azar.

DISCUSION Y CONCLUSIONES.

Dentro de los sistemas de prueba de mutagénesis *Drosophila* posee numerosas ventajas (Zimmering, 1975, 1976 y Zimmering et al., 1986). Una de las pruebas más fáciles y rápidas dentro de este sistema es la de pérdida parcial y total de cromosomas y no disyunción. La pérdida parcial de cromosomas se puede deber a lesiones cromatídicas y cromosómicas lo que trae como consecuencia deleciones y translocaciones que pueden ser ocasionadas por algún agente químico, si esto sucede podemos clasificar al agente como clastogénico, es decir inductor de rompimientos cromosómicos. Por otra parte la pérdida total de cromosomas puede deberse a la no disyunción y a la formación de cromosomas con centrómero inactivado (Valencia et al., 1984). A su vez la no disyunción puede surgir por: a) un error en la conjunción o apareamiento de los cromosomas, la cual conduce a una falla en la separación de los cromosomas en anafase I, b) la falla de las cromátidas hermanas en separarse en anafase II, ó c) la separación precoz de los centrómeros en la anafase I (Zimmering et al., 1986). En *Drosophila* la frecuencia espontánea de no disyunción es de 0.05%, tanto en cromosomas sexuales como en los autosómicos. En los machos la no disyunción trae como consecuencia gametos con un complemento XY y gametos 0; es decir nulos de X o Y (Valencia et al., 1984).

La cruz utilizada en este estudio permite recobrar los eventos de pérdida parcial y total de cromosomas, así como la no disyunción de los mismos, mediante la inspección directa del fenotipo de la F₁ de los machos progenitores tratados. Esto se observa claramente a partir del análisis del esquema de la cruz (cuadro 7) es decir, si se induce la no disyunción en machos, la progenie que se obtiene es machos XO, cuyo fenotipo es y^w y hembras XXY, cuyo fenotipo es B^w.

La LD₅₀ es un parámetro importante en la evaluación genotóxica de un compuesto, dado que proporciona un punto de referencia preciso y cuantificable de la letalidad inducida por el compuesto y por lo tanto sugiere el nivel y magnitud de la potencia tóxica de la sustancia (Casarett y Doull, 1976), así como también es útil en la toma de decisiones con respecto a las concentraciones a utilizar. Existen compuestos los cuales no son letales durante el periodo de tratamiento, sino que el efecto letal se presenta tiempo después o bien, el compuesto puede ser no tóxico, pero si mutagénico. En el presente estudio no se obtuvo la LD dado que en las concentraciones más altas alcanzadas en las disoluciones no se observó toxicidad alguna.

En la primera parte del estudio la desmetil-fruticulina se disolvió en DMSO al 5%, aunque en los 70's se observó que este solvente podía intervenir con la inducción enzimática o actividad necesaria para la conversión de un premutágeno (Valencia et al., 1984, Zimmering et al., 1986) y se ha comprobado que el DMSO es

mutagénico en el sistema bacteriano de Ames, este solvente es ampliamente utilizado en *Drosophila*, puesto que estudios recientes han mostrado que el DMSO *per se* no es mutagénico en este sistema, aunque si puede interactuar con compuestos químicamente semejantes a él (Brodberg et al., 1987). Se decidió utilizar este solvente, puesto que la desmetil-fruticulina es insoluble en agua, y es diferente estructuralmente al DMSO. En estas condiciones, se corrió un control concurrente que consistió de DMSO al 5%. En la tabla IV se observa que dicho control presenta frecuencias que caen dentro del testigo histórico del laboratorio el cual es de 0.10%. En esta misma tabla se observa que en ninguna de las concentraciones (10, 50 y 100 ppm), ni en cada una de las camadas hay diferencias significativas respecto al testigo. Con base en estos resultados, se decidió utilizar otra ruta de administración para la desmetil-fruticulina, ya que con otro vehículo se podrían obtener concentraciones más altas y teniendo como antecedente que la ruta de administración puede influir en la obtención de los resultados, (Kortselius, 1979, Zimmering, et al., 1986). El vehículo utilizado en esta ocasión fue el Tween 80, un saponificador capaz de mantener en suspensión una mezcla homogénea del compuesto. Las concentraciones utilizadas fueron: 1000, 2500 y 5000 ppm. En la tabla II se puede observar que no se encontraron diferencias significativas al comparar dentro de cada camada al control (Tween 80 al 5%) con cada una de las concentraciones utilizadas. Finalmente se llevó a cabo un último experimento con desmetil-fruticulina, en el cual se probó la concentración de 1% (10, 000 ppm) con el fin de verificar los resultados obtenidos anteriormente. Como se puede observar en la tabla III, para esta concentración no se registraron ninguno de los eventos esperados.

Con respecto a la nemorona, ésta no se probó vía inyección, dado que este compuesto es insoluble en agua y es muy poco soluble en DMSO. Por lo anterior se utilizó la ruta de exposición de alimentación, y en este caso el vehículo también fue Tween 80 al 5%. En la tabla IV se puede observar que para las concentraciones utilizadas (1000, 2500 y 5000 ppm) no hay diferencias significativas de éstas respecto al testigo (Tween 80 al 5%) en ninguna de las camadas.

En un intento por recobrar el probable daño inducido, se construyeron las tablas V, VI, VII y VIII, en las cuales se sumó el efecto inducido en las tres camadas por concentración y para el testigo, comparando únicamente las concentraciones con el testigo sin tomar en cuenta en que camada se había inducido el daño. Aunque con esto se pierde información, se puede obtener una visión general de la acción del compuesto en la inducción de eventos genéticos registrables por esta prueba. A través del análisis de estas tablas se puede concluir que tampoco se encuentran diferencias significativas respecto al testigo en cada una de las concentraciones probadas tanto para la desmetil-fruticulina, como para la nemorona en cualesquiera de las tres

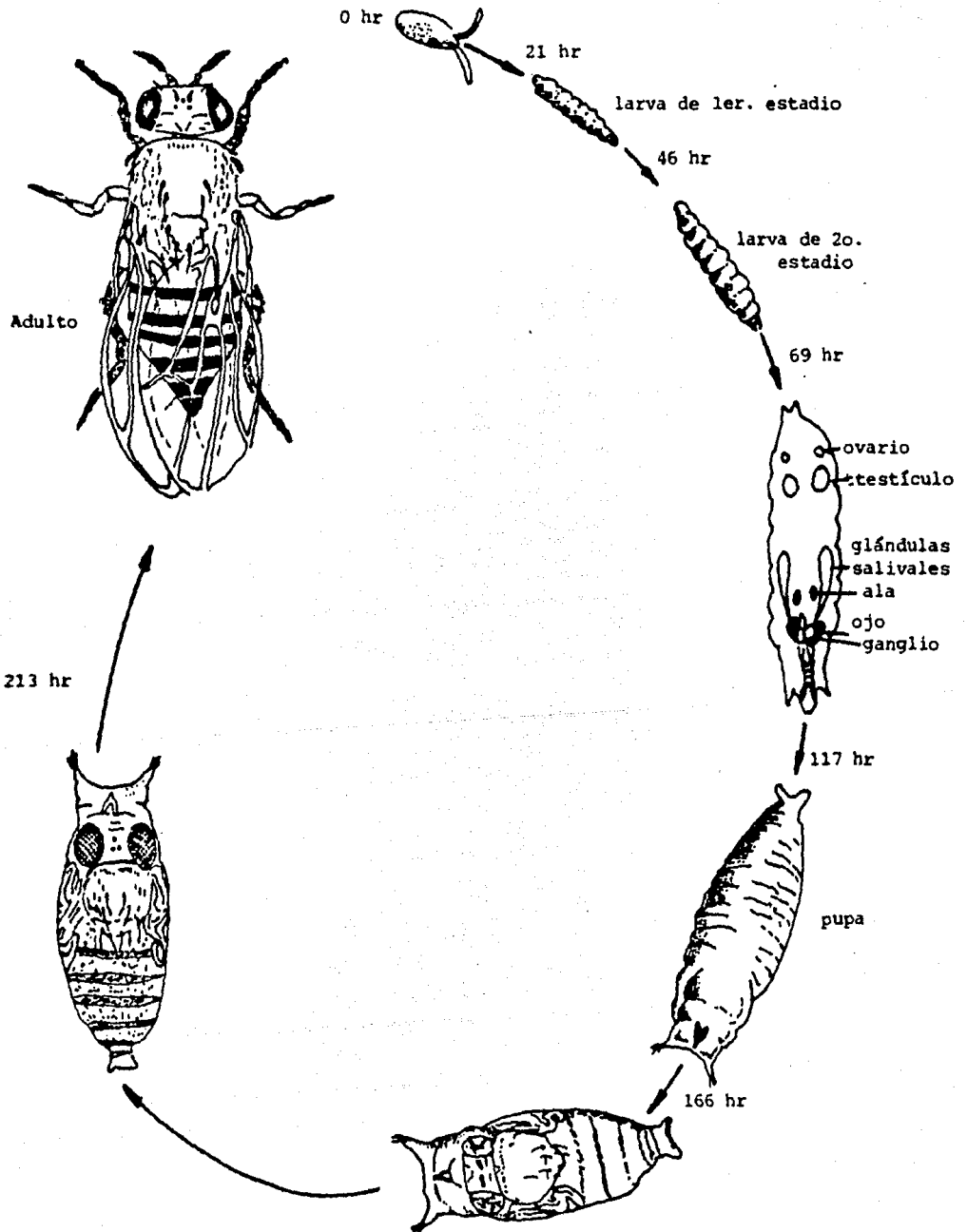
camadas.

De acuerdo a lo anteriormente mencionado se puede decir que tanto la desmetil-fruticulina como la nemorona no inducen pérdida parcial y total de cromosomas, así como la no disyunción de cromosomas en las concentraciones utilizadas en este estudio. Esto no implica que ambos compuestos no sean capaces de inducir

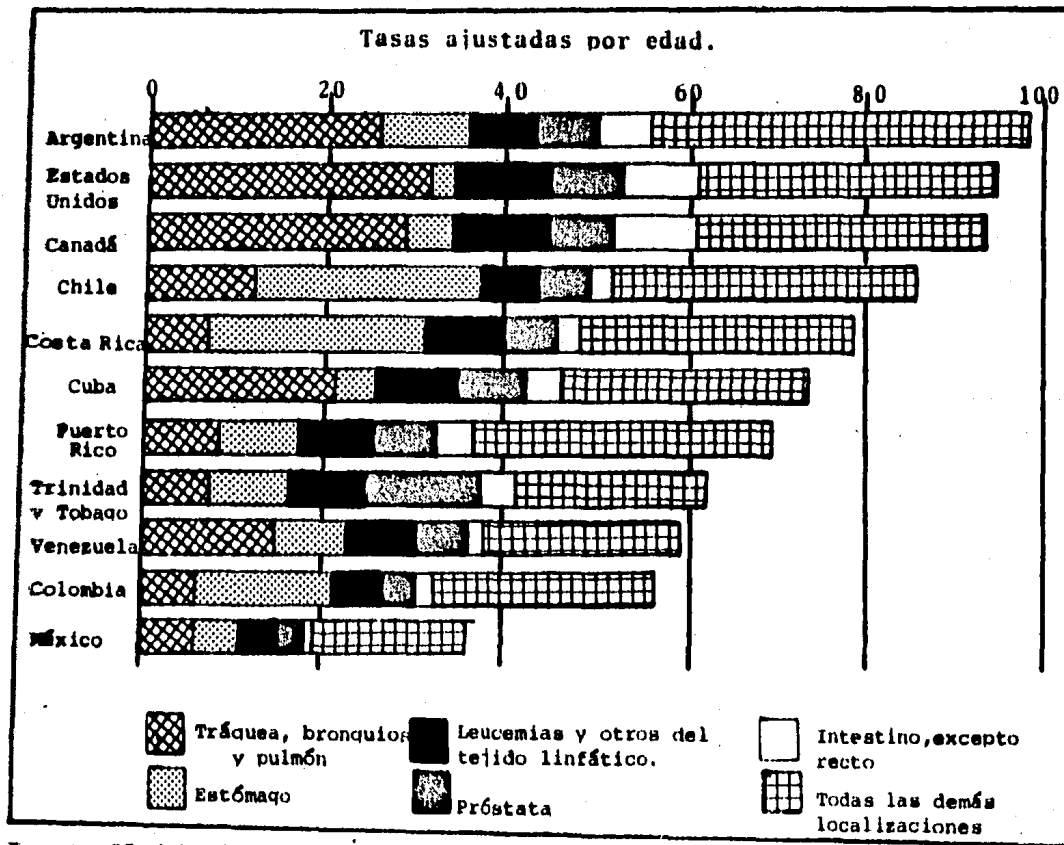
estos tipos de alteraciones genéticas, puesto que una vez que se ha probado un compuesto en un sistema de prueba y no se han encontrado resultados concluyentes se deben ensayar todas las posibilidades existentes dentro del sistema, así como utilizar otros sistemas genéticos en la valoración de alteraciones genéticas inducidas. Dentro de esto último cabe mencionar que las bajas frecuencias que presentó el testigo en el presente estudio, pese a que el tamaño de muestra fue en promedio el de rutina utilizado en el Laboratorio para este sistema de cruce, no se pudieron obtener resultados significativos, por lo que en un futuro se podría utilizar una cepa deficiente en sistemas de reparación, la cual es más sensible en la detección de daño genético inducido, así como también es deseable realizar pruebas colaterales sobre los mismos puntos genéticos terminales en otros sistemas de prueba.

Por último hay que puntualizar que dentro de la quimioterapia los sistemas de mutagénesis constituyen un soporte ambivalente, puesto que si bien un sistema de prueba de este tipo nos puede ayudar a encontrar compuestos que induzcan mutaciones y por lo tanto que sean susceptibles en ser utilizados en la cura del cáncer por métodos químicos, también señalan un punto de advertencia al reflejar claramente la capacidad mutagénica de un compuesto, que probablemente puede alterar no solo a las células malignas que se tratan de combatir, sino que también a las células normales, induciendo posteriores trastornos. Por esto, se debe ser muy cauteloso en la utilización de mutágenos en la quimioterapia, y poner especial énfasis en la ruta de administración y la especificidad que se puede alcanzar con el compuesto.

Fig. 1. Ciclo de vida de *Drosophila melanogaster* (tomado de Baker, W. K. Genetic Analysis, Houghton Mifflin Company, Boston, 1965).



Cuadro I. Tasas de mortalidad por 100 000 hombres, ajustadas por edad, debido a tumores malignos, por localización en países seleccionados.



Fuente: OPS/OMS "Las condiciones de Salud en las Américas 1977-1980"
 Publicación Científica N.º 427, 1982 (tomado de Vega, 1985).

Cuadro 2 Tasas de mortalidad, ajustadas por edad, debido a tumores malignos del estómago y del pulmón por 100 000 habitantes, según sexo, en países seleccionados, alrededor de 1979.

PAIS	HOMBRES		MUJERES	
	ESTOMAGO	PULMON*	ESTOMAGO	PULMON*
Argentina	18.3	25.3	10.3	3.3
Canadá	11.8	28.2	6.9	6.7
Colombia	13.2	5.6	10.4	3.0
Costa Rica	23.1	6.5	14.6	2.6
Cuba	8.6	20.6	4.6	7.1
Chile	31.7	11.3	18.5	3.4
Estados Unidos	7.9	30.7	5.2	9.1
México	4.5	5.8	4.6	2.6
Puerto Rico	16.0	8.0	8.4	3.7
Trinidad Tobago	9.0	7.1	6.7	2.1
Venezuela	11.9	8.8	7.9	3.6

*: incluye tráquea y bronquios

Fuente: OPS/OMS "Las condiciones de salud en las Américas 1977-80",
publicación científica número 427, 1982 (Tomado de Vega, 1985)

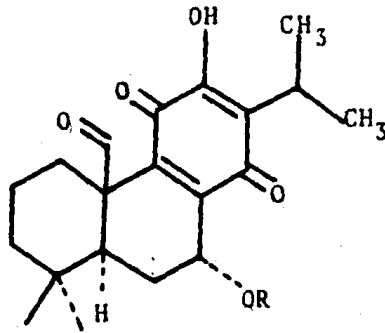
Cuadro 3. SISTEMAS TUMORALES. Criterios de clasificación de una respuesta activa, de los sistemas más comunes en la evaluación del efecto antitumoral de los diversos compuestos. TWI: inhibición del peso del tumor; ILS: incremento de la esperanza de vida; ED₅₀: nivel de dosis en Mg/ml al cual hay una inhibición del crecimiento del 50% de las células tratadas vs. el testigo *in vitro*. (Tomado de Carter y Livingston, 1976)

Clave	Tipo de cáncer y hospedero	Respuesta activa
B1	B16 Melanocarcinoma; ratón	ILS $\geq 40\%$
CA	Adenocarcinoma 755; ratón	TWI $\geq 58\%$
HE	Hela carcinoma humano; cultivo celular	ED ₅₀ ≤ 1.0
KB	Carcinoma epidermoide humano de nasofaringe; cultivo celular	ED ₅₀ ≤ 1.0
LE	Leucemia linfoide L-1210; ratón	ILS $\geq 25\%$
LL	Carcinoma de pulmón de Lewis; ratón	TWI $\geq 58\%$
PS	Leucemia linfocítica P388; ratón	ILS $\geq 25\%$
SA	Sarcoma 180; ratón	TWI $\geq 58\%$
WA	Carcinosarcoma de Walker 256; rata	TWI $\geq 58\%$

CUADRO 4. AGENTES ANTICANCERIGENOS. Principios activos que han sido encontrados en extractos de plantas y su respuesta en los sistemas más comunes de evaluación del efecto antitumoral en mamíferos. (Las claves utilizadas están definidas en el Cuadro 3) (Tomado de Carter y Livingston, 1976)

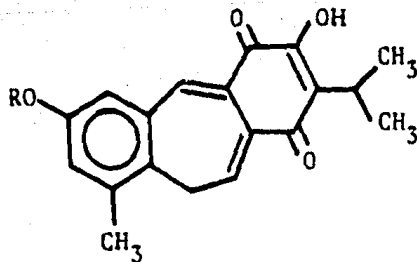
COMPUESTO	ESPECIES (planta de origen)	FAMILIA	ACTIVA	INACTIVA
Elefantin	<i>Elephantopus scultus</i> Bertol.	Asteraceae	WA, KB	LE
Elipictina	<i>Ochrosia odorata</i> (F. Muell.) F. Muell.	Apocynaceae	KB, WA, LE, BI, PS(200)	LL
Emodin	<i>Cassia obtusa</i> Clos	Fabaceae	PS(127), WA	CA, LE, SA, KB
Erioflorin	<i>Eriophyllum lanatum</i> (Pursh) Forb.	Asteraceae	PS(127), KB	LE
Eupatorina	<i>Eupatorium rotundifolium</i> L.	Asteraceae	KB	PS
Geiparvarin	<i>Geigeria salicifolia</i> Schott.	Rutaceae	PS(130), KB	BI, LE, LL
Gossipol	<i>Gossypium hirsutum</i> L.	Malvaceae	LL, WA, PS(150)	BI, CA, LE, SA, KB
Helenalin	<i>Helenium autumnale</i> L.	Asteraceae	PS(220), KB	BI, LE, LL, SA
Holozantona	<i>Holacanthos caryi</i> Gray	Simarubaceae	PS(150), KB	LE
Isogillardina	<i>Geillardia pulchella</i> Fouq.	Asteraceae	KB	
Jacaranaona	<i>Jacaranda carucana</i> Pittier	Bignoneaceae	PS(165), KB	
Jatrofan	<i>Jatropha gossypifolia</i> L.	Euphorbiaceae	PS(125)	
Licorina	<i>Crinum macrantherum</i> Engl.	Anaryllaceae	KB	SA, CA, LE, LL, WA
Maisina	<i>Maytenus buchananii</i> (Loes.) R. Wilczek	Celastraceae	KB	PS
Mezerina	<i>Daphne mezereum</i> L.	Thymelaceae	PS(290)	BI, LL
Merifolia	<i>Thevetia ovata</i> (Cav.) A. DC.	Apocynaceae	LL, SA, KB	LE, PS, WA
Obanogin	<i>Xanthorrhiza simplicissima</i> Marsh.	Ranunculaceae	KB	
Paucina	<i>Baileya pauciradiata</i> Harv. & Gray ex Gray	Asteraceae	PS(138)	BI, LE
Acobiesida A	<i>Acokanthera oblongifolia</i> (Hochst.) Cold	Apocynaceae	KB	
Adioerina	<i>Nerium oleander</i> L.	Apocynaceae	KB	BI, LL, PS in vitro
Alcalina	<i>Arnebia nobilis</i> Rechfil	Boraginaceae	WA	LE, PS, SA, KB
Allanandicina	<i>Allanandra cathartica</i> L.	Apocynaceae	PS in vitro	PS, KB
Anopterina	<i>Anopterus macleanianus</i> F. Muell.	Saxifragaceae	KB	WA, LE
Bailein	<i>Baileya multicaudata</i> Harv. & Gray ex Torr.	Asteraceae	PS in vitro	
Betulin	<i>Alnus firmifolia</i> Fern.	Betulaceae	WA	BI, LL, PS, KB
Bursoran	<i>Bursaria microphylla</i> Gray	Bursariaceae	WA, KB	
Calotropina	<i>Anclepis curassavica</i> L.	Anclepiaceae	KB	LE
Cerberina	<i>Thevetia peruviana</i> (Pers.) K. Schum	Apocynaceae	PS(130), KB	
Cesalin	<i>Caesalpinia gilliesii</i> (Hook.) B. Dietr.	Fabaceae	LL, SA	BI, PS
Crinanina	<i>Crinum macrantherum</i> Engl.	Anaryllidaceae	KB	
Cinaria	<i>Apocynum cannabinum</i> L.	Apocynaceae	KB	CA, LE, LL, PS, SA
Dausin	<i>Ambrosia ambrosioides</i> (Cav.) Payne	Asteraceae	KB	LE
Democollina	<i>Colchicum speciosum</i> Stev.	Liliaceae	PS(150), KB WA, LE	BI, CA, LL, SA
Digitoxina	<i>Digitalis purpurea</i> L.	Scrophulariaceae	KB	CA, LE, PS, SA, WA
Sulcitol	<i>Maytenus senegalensis</i> (Lam.) Exell.	Celastraceae	PS(136)	CA, LE, SA
Rotenona	<i>Borreria trifoliata</i> Lour.	Fabaceae	PS(155), KB	CA, WA, LE, LL, SA
Senecionina	<i>Senecio triangulatus</i> Hook.	Asteraceae	WA, BI	LE, PS, KB
Solanumbina	<i>Nicotiana plumbaginifolia</i> Viv.	Solanaceae	WA	
Solanin	<i>Adenium obesum</i> (Forsk.) Roem. & Schult.	Apocynaceae	KB	PS
Taxodiona	<i>Taxodium distichum</i> (L.) M. Rich.	Taxodiaceae	WA, KB	LE, PS
Taxodona	<i>Taxodium distichum</i> (L.) M. Rich.	Taxodiaceae	KB	
Uvaol	<i>Vaccolinia corymbosa</i> Correa ex Humb. & BonRosaceae		PS(125)	
Vernodalina	<i>Vernonia amygdalina</i> Delile	Asteraceae	WA, KB	
Vernolepina	<i>Vernonia hydnocephala</i> A. Rich.	Asteraceae	WA, PS(145), KB	
Vitaterpina-A	<i>Dematia arborescens</i> (L.) Sleumer	Solanaceae	PS(135), SA	
Zaluzania-C	<i>Zaluzania parthenioides</i> (DC.) Azod.	Asteraceae	PS in vitro	PS

Cuadro 5. Estructura química de la nemorona y la desmetil-fruticulina (tomado de Rodríguez-Hahn, 1986).



R=Ac

Nemorona $C_{22}H_{28}O_4$



R=Me

Desmetil-fruticulina $C_{20}H_{20}O_4$

Cuadro 6 SISTEMAS DE PRUEBA DE USO FRECUENTE. Tipos de daño genético detectado por los sistemas de monitoreo de mutágenos ambientales. 1: letales dominantes; 2: translocaciones; 3: deleciones y duplicaciones; 4: no disyunción; 5: mutaciones y retrmutaciones; 6: locus específico y 7: inducción de recombinación (Tomado de Env. Mut. Soc. 1975).

SISTEMA DE PRUEBA	ORGANISMO	TIPOS DE DAÑOS DETECTADOS						
		Aberraciones Cromosómicas				Mutaciones Génicas		
CATEGORIA		1	2	3	4	5	6	7
Bacterias	<i>Salmonella typhimurium</i>					+		
	<i>Escherichia coli</i>					+		
Hongos	<i>Neurospora crassa</i>			+	+	+	+	
	<i>Aspergillus nidulans</i>				+	+	+	+
	Levaduras	+			+	+	+	+
Plantas	<i>Vicia faba</i>		+	+	+			
	<i>Tradescantia paludosa</i>		+	+	+	+		
Insectos	<i>Drosophila melanogaster</i>	+	+	+	+	+	+	+
	<i>Habrobracon juglandis</i>	+	+			+	+	+
	<i>Bombyx mori</i>	+				+	+	
Cultivo de Células de Mamíferos	Criceto		+	+	+	+		
	Linfoma de ratón		+	+	+	+		
Mamíferos	Ratón	+	+	+	+		+	
	Rata	+	+	+	+			
	Hombre		+	+	+			

Cuadro 7. Progenie normal y excepcional de la cruce de hembras de y^2w^e/y^2w^e y machos y/B^eYy^+ (Modificado de Bernal, 1986).

CRUZA PROGENITORA

P y^2w^e/y^2w^e y/B^eYy^+
 (y^2w^e) Hembras con cuerpo amarillo, (R^e) Machos con ojos en barra
 pelos y cerdas negros, ojos durazno.

Individuos de la primera generación filial (F₁):

EVEN TO GENETICO	GENOTIPO	SEXO	FENOTIPO
Normal	y^2w^e/y	hembra	(y^2) Cuerpo amarillo, pelos y cerdas negros
Normal	y^2w^e/B^eYy^+	macho	(w^eB^e) ojos en barra color durazno.
PERDIDA DEL ALELO B ^e	y^2w^e/Yy^+	macho	(w^e) Ojos color durazno.
PERDIDA DEL ALELO y ⁺	y^2w^e/B^eY	macho	($y^2w^eB^e$) Cuerpo amarillo, pelos y cerdas negros, ojos en barra color durazno
PERDIDA DEL X ó Y ó AMBOS MARCADORES DEL Y	y^2w^e/O y^2w^e/Y	macho estéril macho	(y^2w^e) Cuerpo amarillo, con pelos y cerdas negros, ojos color durazno.
NO DISYUNCION EN MACHOS	$y^2w^e/y/B^eYy^+$	hembra	(R ^e) Ojos en barra.
NO DISYUNCION EN MACHOS	y^2w^e/O	macho estéril	(y^2w^e) Cuerpo amarillo, con pelos y cerdas negros, ojos color durazno.
NO DISYUNCION EN HEMBRAS	O/y	macho estéril	(y) Cuerpo amarillo, con pelos y cerdas cafés.
NO DISYUNCION EN HEMBRAS	$y^2w^e/y^2w^e/B^eYy^+$	hembra	(w^eB^e) Ojos en barra color durazno.
NO DISYUNCION EN HEMBRAS	$y^2w^e/y^2w^e/y$	hembra	(y^2) Cuerpo amarillo con pelos y cerdas negros.

Cuadro 8 Mutagenicidad de diversos anticancerígenos agrupados en A: agentes alquilantes; B: antimetabolitos; C: antibióticos y D: compuestos de extrato de plantas, en los diferentes sistemas de pruebas: NA: en ácido nucleico *in vitro* o *in vivo*; V: en virus *in vitro* o *in vivo*; B: en bacterias; H: en hongos; P: en plantas; t: aplicación en células tumorales *in vivo* o *in vitro*; c: en células normales *in vitro* y v: aplicación *in vivo*; +: resultados positivos; 0: negativos; sp: efecto sobre el uso mitótico; I: inconcluyente (tomado de Vogel y Röhrborn, 1970 apud Cimino et al. 1986).

	NOMBRE COMUN						MAMIFEROS			HOMBRE		
		NA	V	B	H	P	t	c	v	t	c	v
A	Melfalan		+									
	Clorambucil			+								
	Ciclofosfamida					+			+	+	0	0I
	Busulfan					+sp			+		+	+
	Tiotepa					+			+			+
B	Azatioprina	+	0			0sp		sp	I	sp	+	+
	Aminopterina			+		+			+			
	Metotrexato					+					0	0
C	Bleomicina								I			
	Actinomicina (C,D)	+				+sp	+I				+	
	Daumicina	+				+0sp					+	+
	Mitomicina C	+		+	0	+	+I	I			+	+
D	Vincristina										+	+

TABLA I Número y porcentaje de individuos normales y excepcionales obtenidos en F₂ al inyectar machos progenitores de *Drosophila melanogaster* con distintas concentraciones de desmetil-fruticulina. Camadas A, B, C. El testigo fue DMSO al 5 %.

CONCENTRACION CAMADA		PROGENIE NORMAL			PERDIDA TOTAL		PERDIDA PARCIAL	
[ppm]		Hembras	Machos	Total	Hembras	Machos	Machos	
		XX (y ²)	XY (w ² B ⁰)		XXY (B ⁰)	XO (y ² w ²)	B ⁰ (w ²)	y ⁺ (y ² w ² B ⁰)
					x	x		
Testigo	A	1403	1211	2614	1	0.04	4	0.15
10		1458	1245	2703	2	0.07	3	0.11
50		1555	1269	2824	3	0.11	1	0.03
100		1438	1136	2574			1	0.04
TOTALES		5854	4861	10715	6	0.05	9	0.08
Testigo	B	1501	1359	2860			1	0.03
10		1492	1324	2816	2	0.07		
50		1424	1297	2721			4	0.15
100		1435	1226	2661	1	0.04	2	0.07
TOTALES		5852	5206	11058	3	0.03	7	0.06
Testigo	C	1117	975	2092	1	0.05	2	0.10
10		1184	1009	2193	1	0.05		
50		1154	1065	2219	1	0.04	2	0.09
100		1088	899	1987			1	0.05
TOTALES		4543	3948	8491	3	0.03	5	0.06

TABLA II Número y porcentaje de individuos normales y excepcionales obtenidos en F₁ al alimentar machos progenitores de *Drosophila melanogaster* con distintas concentraciones de desmetilfruticilina. Camadas A, B, C. El testigo fue Tween 80 al 5 %.

CONCENTRACION [ppm]	CAMADA	PROGENIE NORMAL			PERDIDA TOTAL		PERDIDA PARCIAL	
		Hembras	Machos	Total	Hembras	Machos	Machos	
		XX (y ²)	XY (w ² B ²)		XXY (B ²)	XO (y ² w ²)	B ² (w ²)	y ² (y ² w ² B ²)
			%	%	%			
Testigo	A	1461	893	2344	1 0.04			
1000		1306	679	1985	1 0.05	4 0.02		
2500		1395	945	2340	1 0.04	2 0.08	1 0.04	
5000		1384	1031	2415	1 0.04			
TOTALES		5546	3538	9084	4 0.04	6 0.07	1 0.01	
Testigo	B	1439	1158	2597				
1000		1494	1113	2607				
2500		1455	1077	2532		3 0.11		
5000		1333	1077	2410		1 0.04		
TOTALES		5721	4425	10146		4 0.04		
Testigo	C	1446	1050	2496		1 0.04		
1000		1477	998	2475		2 0.08		
2500		1328	819	2147		2 0.09		
5000		1174	998	2172	2 0.09	1 0.05	1 0.05	
TOTALES		5425	3865	9290	2 0.02	6 0.06	1 0.01	

TABLA III Número y porcentaje de individuos normales y excepcionales obtenidos en F_1 al alimentar machos progenitores de *Drosophila melanogaster* con desmetil-fruticulina al 1%. Camadas A, B, C. El testigo fue Tween 80 al 5%.

CONCENTRACION [%]	CAMADA	PROGENIE NORMAL			PERDIDA TOTAL		PERDIDA PARCIAL	
		Hembras XX (y^2)	Machos XY (w^2B^2)	Total	Hembras XXY (B^2)	Machos XO (y^2w^2)	Machos B ⁺ y ⁺ (w^2)	($y^2w^2B^2$)
Testigo 1	A	898	669	1567	1 0.06	1 0.06		
		889	663	1552				
		TOTALES	1787	1332	3119	1 0.03	1 0.03	
Testigo 1	B	1354	826	2180	1 0.05	2 0.09		
		1205	650	1855				
		TOTALES	2559	1476	4035	1 0.02	2 0.05	
Testigo 1	C	1015	644	1659	1 0.06			
		800	506	1306				
		TOTALES	1815	1150	2965	1 0.03		

TABLA IV Número y porcentaje de individuos normales y excepcionales obtenidos en F₁ al alimentar machos progenitores de *Drosophila melanogaster* con distintas concentraciones de nemorona. Camada A, B, C. El testigo fue Tween 80 al 5%.

CONCENTRACION [ppm]	CAMADA	PROGENIE NORMAL			PERDIDA TOTAL		PERDIDA PARCIAL	
		Hembras XX (y ²)	Machos XY (w=B ^o)	Total	Hembras XXY (B ^o)	Machos XO (y ² w ^o)	Machos B ^o (w ^o)	y ⁺ (y ² w=B ^o)
					%	%	%	%
Testigo	A	1704	1301	3005		2 0.07		
1000		1734	1171	2905	1 0.03	2 0.07	1 0.03	
2500		1709	1143	2852		2 0.07		
5000		1760	1134	2894	2 0.07		2 0.07	
TOTALES		6907	4749	11656	3 0.03	6 0.05	3 0.03	
Testigo	B	1449	976	2425		1 0.04		
1000		1404	940	2344		2 0.08		
2500		1300	792	2092	3 0.14			
5000		1535	1080	2615	1 0.04	1 0.04	1 0.04	1 0.04
TOTALES		5688	3788	9476	4 0.04	4 0.04	1 0.01	1 0.01
Testigo	C	1126	668	1794		1 0.06		
1000		1366	835	2201	1 0.04	3 0.14	1 0.04	
2500		1056	652	1708		1 0.06		
5000		1192	809	2001		1 0.05	2 0.10	
TOTALES		4740	2964	7704	1 0.01	6 0.08	3 0.04	

TABLA V Número y porcentaje de individuos normales y excepcionales obtenidos en F_2 al inyectar machos progenitores de *Drosophila melanogaster* con distintas concentraciones de desmetil-fruticulina. Suma de las camadas A, B, C. El testigo fue DMSO al 5%.

CONCENTRACION CAMADA		PROGENIE NORMAL			PERDIDA TOTAL		PERDIDA PARCIAL	
[ppm]		Hembras Machos Total			Hembras Machos		Machos	
		XX	XY		XXY	XO	B ^o	y ⁺
		(y ²)	(w=B ^o)		(B ^o)	(y ² w ^o)	(w ^o)	(y ² w=B ^o)
					X	X		
Testigo	A	1403	1211	2614	1	0.04	4	0.15
Testigo	B	1501	1359	2860			1	0.03
Testigo	C	1117	975	2092	1	0.05	2	0.10
TOTALES		4021	3545	7566	2	0.03	7	0.09
10	A	1458	1245	2703	2	0.07	3	0.11
10	B	1492	1324	2816	2	0.07		
10	C	1184	1009	2193	1	0.05		
TOTALES		5562	3578	7712	5	0.06	3	0.04
50	A	1555	1269	2824	3	0.11	1	0.03
50	B	1424	1297	2721	4	0.15		
50	C	1154	1065	2219	1	0.04	2	0.09
TOTALES		4133	3631	7764	8	0.10	3	0.04
100	A	1438	1136	2574			1	0.04
100	B	1435	1226	2661	1	0.04	2	0.07
100	C	1088	899	1987			1	0.05
TOTALES		3961	3261	7222	1	0.01	4	0.05

TABLA VI Número y porcentaje de individuos normales y excepcionales obtenidos en F₁ al alimentar machos progenitores de *Drosophila melanogaster* con distintas concentraciones de desmetil-fruticulina. Suma de las camadas A, B, C. El testigo fue Tween 80 al 5%.

CONCENTRACION [ppm]	CAMADA	PROGENIE NORMAL			PERDIDA TOTAL		PERDIDA PARCIAL
		Hembras XX (y ²)	Machos XY (w ² B ^w)	Total	Hembras XXY (B ^w) %	Machos XO (y ² w ^w) %	Machos B ^w y ^w (w ^w)(y ² w ^w B ^w) %
Testigo	A	1461	883	2344	1 0.04		
Testigo	B	1439	1158	2597			
Testigo	C	1446	1050	2496		1 0.04	
TOTALES		4346	3091	7437	1 0.01	1 0.01	
1000	A	1306	679	1985	1 0.05	4 0.02	
1000	B	1494	1113	2607			
1000	C	1477	998	2475		2 0.08	
TOTALES		4277	2790	7067	1 0.01	6 0.08	
2500	A	1395	945	2340	1 0.04	2 0.08	1 0.04
2500	B	1455	1077	2532		3 0.11	
2500	C	1328	819	2147		2 0.09	
TOTALES		4178	2841	7019	1 0.01	7 0.10	1 0.01
5000	A	1384	1031	2415	1 0.04		
5000	B	1333	1077	2410		1 0.04	
5000	C	1174	998	2172	2 0.09	1 0.05	1 0.05
TOTALES		3891	3106	6997	3 0.04	2 0.03	1 0.01

TABLA VII Número y porcentaje de individuos normales y excepcionales obtenidos en F₁ al alimentar machos progenitores de *Drosophila melanogaster* con distintas concentraciones de nemorona. Suma de las camadas A, B, C. El testigo fue Tween 80 al 5%.

CONCENTRACION [ppm]	CAMADA	PROGENIE NORMAL			PERDIDA TOTAL		PERDIDA PARCIAL	
		Hembras	Machos	Total	Hembras	Machos	Machos	
		XX	XY		XXY	XO	B ^o	y ⁺
		(y ²)	(n ^o B ^o)		(B ^o)	(y ² n ^o)	(n ^o)	(y ² n ^o B ^o)
				X	X	X	X	
Testigo	A	1704	1301	3005		2	0.07	
Testigo	B	1449	976	2425		1	0.04	
Testigo	C	1126	668	1794		1	0.06	
TOTALES		4279	2945	7224		4	0.05	
1000	A	1734	1171	2905	1	0.03	2	0.07
1000	B	1404	940	2344		2	0.08	
1000	C	1366	835	2201	1	0.04	3	0.14
TOTALES		4504	2946	7450	2	0.03	7	0.09
2500	A	1709	1143	2852		2	0.07	
2500	B	1300	792	2092	3	0.14		
2500	C	1056	652	1708		1	0.06	
TOTALES		4065	2587	6652	3	0.04	3	0.08
5000	A	1760	1134	2894	2	0.07		2
5000	B	1535	1080	2615	1	0.04	1	0.04
5000	C	1192	809	2001		1	0.05	
TOTALES		4487	3023	7510	3	0.04	2	0.03
							5	0.07
							1	0.01

TABLA VIII Número y porcentaje de individuos normales y excepcionales obtenidos en F₁ al alimentar machos progenitores de *Drosophila melanogaster* con desmetil-fruticulina al 1%. Suma de las camadas A, B, C. El testigo fue Tween 80 al 5%.

CONCENTRACION	CAMADA	PROGENIE NORMAL			PERDIDA TOTAL		PERDIDA PARCIAL	
		Hembras XX (y^2)	Machos XY ($w=B^w$)	Total	Hembras XXY (B^w)	Machos XO (y^2w^w)	Machos B ^w y ⁺ (w^w)	($y^2w^wB^w$)
					X	X		
testigo	A	898	669	1567	1 0.06	1 0.06		
testigo	B	1354	826	2180	1 0.05	2 0.09		
testigo	C	1015	644	1659	1 0.08			
TOTALES		3267	2139	5406	3 0.05	3 0.05		
1	A	889	663	1552				
1	B	1205	650	1855				
1	C	800	506	1306				
TOTALES		2894	1819	4713				

AGRADECIMIENTOS.

Al pueblo de México, por hacer posible una educación gratuita, a costa de sus impuestos.

Quisiera agradecer a la directora del presente trabajo, la M. en C. Patricia Ramos Morales, quien siempre estuvo en la mejor disposición de orientarme y exponer sus puntos de vista a lo largo del desarrollo de esta investigación, y con ello contribuyó a que el manuscrito final tuviera un mayor rigor científico y una mejor presentación.

Agradezco a la Dra. Rosario Rodríguez Arnaiz, quien además de revisar este trabajo tuvo la paciencia y el tiempo para ayudarme a aclarar algunas dudas respecto al presente trabajo y en el campo de la Genética.

También deseo agradecer a las personas que accedieron a revisar y corregir este trabajo: al M en C. Mario Altamirano Lozano, Biól. Rosa María Bernal Salas y Biól. Patricia Orozco Soto.

Agradezco a todos los compañeros del Laboratorio de Genética y Evolución "*Theodosius Dobzhansky*", ya que sin su valiosa ayuda no hubiese sido posible la realización de este trabajo.

Agradezco a todas las personas que, en una u otra forma colaboraron en el desarrollo del presente trabajo. En especial a los Biólogos Juan Carlos Gaytán Oyarzun y Dora Lidia Rodríguez Zúñiga.

Al Biól. Moisés Armando Luis por brindarme todo su apoyo, por estar siempre en la disponibilidad de ayudarme con la transcripción del trabajo en la computadora y por realizar las tablas en su totalidad.

A mi familia por alentarme siempre con entusiasmo para la conclusión de este trabajo.

BIBLIOGRAFIA:

- Ames, B.N., W.E. Durston, E. Yamasaki y F.D. Lee (1973). Carcinogens are mutagens: a simple test system combining liver homogenates for activation and bacteria for detection. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 70: 2281-2285.
- Antoun, M.D., D. Abrahamson, R.L. Tyson, C. Chang, J.L. MacLaughlin, G. Peck y J.M. Cassady (1981). Potential antitumor agents. XVII. Physalin B and 25, 26-epidihydrophysallin C from *Witheringia coccoloboides* Jour. *Nat. Prod.* 44(5): 579-585.
- Archivo Estadístico del Instituto Nacional de Cancerología. Datos registrados hasta 1986.
- Arisawa, M., S. Funayama, J.M. Pezzuto, A.D. Kinghorn, G.A. Cordell y N.R. Farnsworth (1984). Potential anticancer agents XXXII. Hydroquinone from *Ipomopsis aggregata* Jour. *Nat. Prod.* 47 (2): 393-394.
- Baars, A.J., G.H. Blijleven, G.R. Mohn, A.T. Nataranjan y D. D. Breimer (1980). Preliminary studies on the ability of *Drosophila* microsomal preparations to active mutagens and carcinogens. *Mutat. Res.* 72: 257-264.
- Bernal, R.M. (1986). Estudio del efecto del Paraquat sobre la pérdida parcial y total de cromosomas sexuales (SCLT) en *Drosophila melanogaster*. Tesis Profesional para obtener el Título de Biólogo. México, U.N.A.M.
- Brodberg, R.K., M.K. Mitchell, S.L. Smith y R.C. Woodruff (1987). Specific reduction of N,N-Dimethylnitrosamine Mutagenicity in *Drosophila melanogaster* by Dimethyl Sulfoxide. *Environ. Mol. Mut.* 10: 425-432.
- Carter, S.K., y R.B. Livingston (1976). Plant products in cancer chemotherapy. *Cancer. Treat. Rep.* 60(8): 1141-1156.
- Casarett, L.J. y J. Doull (1975). *Toxicology*. Macmillan Publishing Co. Inc. Nueva York. 25-42 pp.
- Cortinas de Nava, C., P. Ostrosky y S. Galván (1977) Principios de mutagénesis y su relación con carcinogénesis y teratógénesis. En el Primer Curso Multinacional de Métodos para la Detección de Mutágenos y Carcinógenos ambientales, organizado por el Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM, en diciembre de 1977.

- Chandley, A.C. y A. J. Bateman (1962). Timing of spermatogenesis in *Drosophila melanogaster* using tritiated thymidine. *Nature* 20: 299-300.
- De Serres, F.J. (1979). Evaluation of test for mutagenicity as indicators of environmental mutagens and carcinogens. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 75-84.
- Demerec, M. (1965). *Biology of Drosophila*. Hafner Publishing Company. Nueva York. 633 pp.
- Duh, C., C.H. Ohoebe, Jr., J.M. Pezzuto, A.D. Kinghorn, y N.R. Farnsworth (1986). Plant anticancer agents, XLII. Cytotoxic constituents from *Wikstroemia elliptica*. *Jour. Nat. Prod.* 49(8): 706-709.
- Environmental Mutagen Society (1976). Environmental mutagen hazards. *Science* 187: 503-514.
- Galicia A., B. Esquivel, A.A. Sánchez, J. Cárdenas, T.P. Ramamoorthy y L. Rodríguez-Hahn (1987). Abietane diterpenoids from *Salvia pubescens*. *Phytochemistry*. 27(1): 217-219.
- Gatti, M., C. Tanzarella, S. Pimpinelli y A. De Marco (1974). Larval ganglia of *Drosophila melanogaster* as a new test for the study in vivo of induced chromosome aberrations. *Mutat. Res.* 22: 55-62.
- Graff, U., H. Juon, A.J. Katz, H. Frei y F.E. Würgler, (1983). A pilot study on new *Drosophila* spot test. *Mutat. Res.* 120: 233-239.
- Graff, U., F.E. Würgler, A.J. Katz, H. Frei, H. Juon, C.B. Hall y P.G. Kale (1984). Somatic Mutation and Recombination Test in *Drosophila melanogaster*. *Environ Mut.* 6: 153-188.
- Hallstrom, I., J. Magnusson y C. Ramel (1982) Relation between the somatic toxicity of dimethylnitrosamine and genetically determined variation in the level and induction of cytochrome P450 in *Drosophila melanogaster*. *Mutat. Res.* 92: 161-168.
- Hartwell, J.L. (1976). Types of anticancer agents isolated from plants. *Can. Trat. Rep.* 60(8): 1031-1068.
- Hellman, K. (1972). Anticancer drugs. *Chem. Brit.* 8(2): 69-72.
- Index Merck (1983). *Encyclopedia of chemical and drugs publish.* by Merck & Co. Stetcher, P.G. Ed. U.S.A. 354 pp.

- Kastenbaum, M.A. y K.O. Bowman (1970). Tables for determining the statistical significance of mutation frequencies. *Mutat. Res.* 9: 527-549.
- Khilman, B.A. (1975). Roots tips of *Vicia faba* for the study of the induction of chromosomal aberrations. *Mutat. Res.* 31: 401-413.
- Kilbey, B.J., D.J. MacDonald., C. Auberbach, F.H. Sobels y E.W. Vogel (1981). The use of *Drosophila melanogaster* in tests for environmental mutagens. *Mutat. Res.* 85: 141-146.
- Kupchan, S.M., K. Aziz y C. Marcks (1968). Taxodione and Taxodone two novel diterpenoid quinone methide tumor inhibitors from *Taxodium distichum*. *Jour. Am. Chem. Soc.* 90(21): 5923-5924.
- Kupchan, S.M., K. Aziz y C. Marcks (1969). Tumor inhibitors XLVIII. Taxodione and Taxodone, two novel diterpenoid quinone methide tumor inhibitors from *Taxodium distichum*. *Jour. Org. Chem.* 34(12): 3912-3918.
- Kupchan, S.M. (1974). Novel natural products with antitumor activity. *Fed. Prod.* 33(11): 2288-2295.
- Lee, W.R., S. Abrahamson, R. Valencia, F.E. Von Halle y S. Zimmering. (1983). The sex-linked test for mutagenesis in *Drosophila melanogaster*. *Mutat. Res.* 123: 183-279.
- Lindsley, D.L. y R. Grell. (1968). *Genetic Variations of Drosophila melanogaster*. Carnegie Institution of Washington Publication. Washington. 472 pp.
- Loprieno, N (1980). General principles of Genetic Toxicology and Methods for Mutagenesis Assessment. En *The principles and Methods in Modern Toxicology*. Galli, C.L., S.D. Murphy y R. Paoletti editores. Elsevier. Holanda. 1980.
- Ma T.H. (1979). Micronuclei induced by x-rays and chemical mutagens in meiotic pollen mother cells of *Tradescantia*. *Mutat. Res.* 75: 307-313.
- Maron, D.M. y B.N. Ames (1983). Revised methods for *Salmonella* mutagenicity test. *Mutat. Res.* 113: 173-215.
- Powell, R. y C.R. Smith, Jr (1981). An investigation of the antitumor activity of *Sesbania drummondii* *Jour. Nat. Prod.* 44(1): 86-90.
- Pratt W. y M.D. Ruddon (1979). *The anticancer drugs*. Nueva York. Oxford University Press EUA. 323pp.

- Ramamoorthy, T.P. (1984). A new species of *Salvia* (Lamiaceae) from the Sierra de los Tuxtlas, Mexico. *Plant. Sys. E.* 146(1/2): 141-143.
- Rodríguez-Hahn, L., B. Esquivel., C. Sánchez, J. Cárdenas, L. Estebanes, M. Soriano-García, R. Toscano y T.P. Ramamoorthy (1986). New highly diterpene quinones from *Salvia fruticulosa* (Labiatae). *Tetrahedron. Letters.* 27(45): 5449-5462.
- Rodríguez-Hahn, L., B. Esquivel., C. Sánchez, L. Estebanes, J. Cárdenas, M. Soriano-García, R. Toscano y T.P. Ramamoorthy (en prensa). The abietane type diterpenoids from *Salvia fruticulosa* (Labiatae). A revision of the structure of fruticulin B, an Abietanoid 1, 4 anthracene quinone. *Phytochemistry.*
- Ruangrungsi, N. y A. Rivepiboon. (1987). Constituents of *Paramichelia baillonii*; A new antitumor germacranolide alkaloid. *Jour. Nat. Prod.* 50(5): 891-896.
- Russell, L.B. y B.E. Matter (1980). Whole-mammal mutagenicity tests: evaluation of five methods. *Mutat. Res.* 75: 279-302.
- Schuler, R.L., B. Hardin y R.W. Niemeir (1982). *Drosophila* as a tool for the rapid assessment of chemicals for teratogenicity. *Teratogenesis, Carcinogenesis and Mutagenesis 2*: 293-301.
- Sparrow, A.H., L.A. Schairer y R. Villalobos-Pietrini (1974). Comparasion of somatic mutation rates induced in *Tradescantia* by chemical and physical mutagens. *Mutat. Res.* 26: 265-276.
- Stock, J.A. (1960) Chemotherapy of cancer. *Chem. Brit.* 6(1): 11-16.
- Valencia, R., S.L. Abrahamson, W.R. Von Halle, E.S. Woodruff, R.C. Wunrgler, F.E. y S. Zimmering. (1984). Chromosome mutation test (SCLT) for mutagenesis in *Drosophila melanogaster*. *Mutat. Res.* 130: 61-88.
- Vega, S.G. (1985). Evaluación epidemiologica de riesgos causados por agentes químicos ambientales. Toxicología IV. Carcinogénesis Química. Centro Panamericano de Ecología Humana y de Salud, Organización Panamericana de la Salud y la Organización Mundial de la Salud. 59pp.
- Vogel, E. y F.H. Sobels (1976). The function of *Drosophila* in genetic toxicology testing chemical mutagens, principles and methods for their detection. 4 Ed. Hollander Plenum Press. Nueva York. pp 93-142.

- Vogel, E. y G. Röhrborn (1987). *Chemical Mutagenesis in mammals and man*. Nueva York. 519 pp.
- Zijlstra, J.A. (1984). Bioactivation and inactivation of Mutagens in *Drosophila*. *Mutat. Res.* 130: 276-322.
- Zimmering, S. (1975) Utility of *Drosophila* for detection of potential environmental chemical mutagens. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 269: 26-33.
- Zimmering, S. (1976). **Selected methodologies for mutagenicity testing in *Drosophila melanogaster***. Brown University. 1-26 pp.
- Zimmering, D., J.M. Mason y C. Osgood (1986) Current status of aneuploidy testing in *Drosophila*. *Mutat. Res.* 167:71-87.
- Zimmerman, F.K., R.C. Von Borstel, E.S. Von Halle, J.M. Parry, D. Siebert, G. Zetterberg, R. Barale, y N. Loprieno. (1984). Testing of chemical for genetic activity with *Saccharomyces cerevisiae*: a report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. *Mutat. Res.* 133: 199-244.