



00346
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA ⁶
DE MEXICO _{24.}

FACULTAD DE CIENCIAS
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

CARACTERIZACION GENOTOXICA DE LA
ALFA-ASARONA Y ALGUNOS COMPUESTOS
RELACIONADOS EN CELULAS SOMATICAS DE
Drosophila melanogaster.

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE
MAESTRO EN CIENCIAS
(BIOLOGIA CELULAR)
P R E S E N T A :
BIOL. JULIAN MALDONADO LUIS

DIRECTORA: DRA. PATRICIA RAMOS MORALES



1987
TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

**ESTA TESIS SE REALIZÓ EN EL LABORATORIO DE GENÉTICA
"THEODOSIUS DOBZHANSKY"
DE LA FACULTAD DE CIENCIAS**

**CON EL APOYO DE LA
DIRECCIÓN GENERAL DE ASUNTOS DEL PERSONAL ACADÉMICO
(DGAPA)
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

Y FORMÓ PARTE DEL PROYECTO:

**"SÍNTESIS, FARMACOLOGÍA Y TOXICOLOGÍA DE AGENTES HIPOLIPIDÉMICOS
POTENCIALES ANÁLOGOS DE α -ASARONA". CLAVE: M4949
CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA
(CONACYT).**

AGRADECIMIENTOS

A los miembros del Comité Tutorial:

**Dra. Patricia Ramos Morales
Dr. Germán Chamorro Cevallos
Dra. Cristina Pérez-Amador y Barrón**

Por sus valiosos aportes y críticas durante el desarrollo de este proyecto.

A los miembros del Jurado:

**Dr. René de Jesús Cárdenas Vázquez
Dr. Javier Espinosa Aguirre
Dra. Lena Ruiz Azuara de Ramirez
M. en C. Aida Nelly García Argéez**

Por sus comentarios y sugerencias en la revisión de este trabajo.

A los compañeros de trabajo del Laboratorio de Genética.

A mis padres:

**Prócoro Maldonado García
Catalina Luis de Maldonado**

**CARACTERIZACIÓN GENOTÓXICA DE LA α -ASARONA Y ALGUNOS COMPUESTOS
RELACIONADOS EN CÉLULAS SOMÁTICAS DE Drosophila melanogaster.**

INDICE	pág
RESUMEN	2
INTRODUCCIÓN	5
Uso de las plantas medicinales	5
Colesterol y agentes hipocolesterolemiantes	7
<u>Gutteria gaumeri</u>	8
α-Asarona	9
<u>Drosophila melanogaster</u>	17
Prueba de mutación y recombinación somáticas	18
OBJETIVOS	23
MATERIAL Y MÉTODO	24
Compuestos utilizados	24
Líneas de <u>Drosophila</u>	24
Protocolo 72 x 48 h	26
Protocolo 72 x 6 x 48 h	26
Fijación y elaboración de preparaciones	28
Análisis estadístico	28
RESULTADOS	30
DISCUSIÓN	59
CONCLUSIONES	67
REFERENCIAS	68

CARACTERIZACIÓN GENOTÓXICA DE LA α -ASARONA Y ALGUNOS COMPUESTOS RELACIONADOS EN CÉLULAS SOMÁTICAS DE Drosophila melanogaster.

RESUMEN

La α -asarona (1-propenil 2,4,5-trimetoxibenceno) es el principio activo mayoritario de Guatteria guameri, árbol de Yucatán conocido comúnmente como "yumel". Este compuesto ha mostrado propiedades hipocolesterolemiantes importantes; además se han obtenido otros compuestos análogos 4-propenil-1,2-dimetoxibencenos 5-sustituídos, los cuales han mostrado tener propiedades similares.

Algunos estudios sobre la toxicidad del extracto de la planta y de la α -asarona, mostraron mutagenicidad en la línea TA100 de Salmonella typhimurium; induce incrementos ligeros en el intercambio de cromátidas hermanas en linfocitos humanos in vitro y células de médula ósea murina in vivo. Además produce toxicidad materna y efectos embriotóxicos en ratas tratadas con 50-75 mg/kg/día. En células del hígado, la α -asarona redujo la secreción de lípidos y la síntesis de proteínas. Una forma isomérica, la β -asarona, ha mostrado ser carcinogénica en ratas.

Los efectos tóxicos de la α -asarona sugieren precaución en el uso de la planta y resulta importante estudiar algunos de los aspectos de la toxicología de la misma y de sus análogos.

En este trabajo se determinó el potencial genotóxico de la α -asarona y cuatro análogos derivados de 4-propenil-1,2-dimetoxibenceno 5-sustituídos, en células somáticas de Drosophila melanogaster, mediante la prueba de mutación y recombinación y mutación somáticas, (Somatic Mutation And Recombination Test, SMART) en células de las alas.

Larvas de tercer estadio se expusieron crónicamente a 50, 75, 100, 125 y 150 ppm de los compuestos y en cada caso se corrió un testigo negativo con etanol y Tween 80.

Ya que la α -asarona ha mostrado diversos efectos relacionados con algunos procesos metabólicos, se evaluaron los efectos de los compuestos administrados ante el daño inducido por un agente alquilante indirecto (que requiere activación metabólica). Para estudiar la interacción de los compuestos con el promutágeno alquilante N-nitroso-dimetilamina (DMN), las larvas se trataron con esta nitrosamina en una exposición aguda y posteriormente con los compuestos bajo prueba de manera crónica.

Por otra parte se realizaron experimentos con el isómero β -asarona (el cual ha sido reportado previamente como un carcinógeno potencial) para comparar su genotoxicidad con la de los compuestos análogos. La β -asarona se administró crónicamente a concentraciones de 18.5, 46.25, 92.5, 185 y 370 ppm en medio instantáneo.

Se hicieron además experimentos con una infusión acuosa al 100 y 50% de la planta para probar su actividad con y sin DMN, en una exposición crónica. Cada experimento se efectuó por duplicado, y el análisis se realizó sobre 80 - 120 alas por tratamiento.

Los resultados mostraron que sólo dos compuestos fueron positivos en la SMART para la inducción de manchas grandes: α -asarona (100 ppm), y el compuesto 6 (125 ppm). Por otra parte la β -asarona resultó positiva para manchas chicas, grandes y totales a 185 y 370 ppm.

Los compuestos no modificaron la inducción de manchas por la DMN, sin embargo, el análisis de su distribución por mosca con la prueba de U de Mann-Whitney-Wilcoxon mostró algunas diferencias significativas entre las concentraciones probadas.

La infusión al 100 y 50% de Guatteria sp. incrementó de manera significativa la frecuencia de manchas en comparación con el lote testigo e incrementó ligeramente la frecuencia de manchas inducidas por la DMN.

Los resultados obtenidos con β -asarona concuerdan con estudios previos, mostrando efectos positivos evidentes, a diferencia de la α -asarona y los otros análogos. De los resultados obtenidos se desprende que si bien los compuestos probados no incrementan la frecuencia basal de manchas mosaico en las alas de Drosophila,

podrían modificar la distribución de las mismas, como se observó en los tratamientos con la DMN.

Los efectos positivos con la infusión de Guatteria sp sugieren la presencia de β -asarona en la corteza de la planta. Se requiere realizar otros bioensayos y pruebas de metabolismo para tener una mayor seguridad sobre el uso de este tipo de compuestos como posibles agentes terapéuticos.

INTRODUCCIÓN

Uso de las plantas medicinales.

En años recientes ha renacido el interés hacia los sistemas fitoterapéuticos y un gran número de plantas son analizadas química y farmacológicamente en relación a su posible valor medicinal. Las plantas son fábricas que producen un vasto arreglo de estructuras químicas poco comunes que muestran una variedad de actividades biológicas. Como resultado de los modernos procedimientos de aislamiento y experimentación farmacológica, nuevas drogas de origen vegetal son utilizadas en medicina: compuestos puros aislados (principios activos) o fármacos sintéticos. En adición a su uso como fármacos en una forma química no modificada, los constituyentes de la planta pueden servir como materia prima de modificación sintética. Con frecuencia, los análogos de un compuesto base pueden exhibir efectos farmacológicos no anticipados y además ellos mismos pueden ser estructuralmente modificados. Ya que las plantas pueden tener cientos o miles de metabolitos, hay un gran interés en el reino vegetal como una posible fuente de nuevos compuestos para su introducción en los programas de evaluación terapéutica (Evans, 1991; Kinghorn, 1995; Farnsworth, 1994).

De las 25,000-50,000 especies de plantas estimadas en el mundo, sólo un pequeño porcentaje ha sido investigado fitoquímicamente y la fracción sujeta a evaluación biológica o farmacológica es aún mas baja (Hostettmann et al., 1995).

En el siglo XIX inició una era en la que los principios activos o metabolitos secundarios de plantas medicinales comenzaron a extraerse, y estos constituyentes purificados fueron introducidos en terapia, como fue evidenciado por la morfina, quinina, atropina, papaverina, cocaína y pilocarpina. Durante el siglo XX se han seguido incorporando drogas importantes derivadas de plantas como la digitoxina, digoxina, ergometrina, ergotamina, reserpina, tubocurarina, vinblastina y vincristina (Kinghorn, 1992; Cox 1994; Hostettman et al., 1995).

Los hallazgos etnobotánicos frecuentemente ignorados dan las bases para dirigir estudios sobre materiales vegetales que pueden ser analizados con metodologías encaminadas a conocer su actividad en bioensayos apropiados y, cuando éstos son significativos, se procede al aislamiento químico y la caracterización de los principios activos. Posteriormente, se llevan al cabo experimentos de estructura actividad y estudios para revelar sus mecanismos moleculares de acción (Mitscher et al, 1992; Lewis, 1992).

Los productos naturales derivados de las plantas o principios activos que son usados como agentes terapéuticos son representantes principalmente de varios tipos estructurales de compuestos y metabolitos secundarios: alcaloides, glicósidos esteroidales, compuestos que incluyen aceites volátiles, terpenoides y fenilpropanoides (principalmente usados como saborizantes), grasas y ceras (usados para preparar bases de ungüentos y supositorios), aceites fijadores (usados como emolientes en ungüentos y linimentos), gomas y mucilagos (hidrocoloides usados como emulsificantes y agentes suspensores), y polisacáridos (usados en pulverizadores y ciertos productos de diagnóstico) (Evans, 1991; Kinghorn, 1992).

De acuerdo a la compañía Merck, por cada 10,000 sustancias que son evaluadas en una batería de ensayos biológicos, 20 son seleccionadas para pruebas en animales; de éstas 20, 10 serán evaluadas en humanos y solamente una será aprobada por la Food and Drugs Administration (FDA) de Estados Unidos. Este proceso requiere casi 12 años a un costo de \$ 231 millones de dólares aproximadamente (Farsworth, 1994).

Muchas de las principales firmas farmacéuticas de los países desarrollados están interesadas en adquirir tantas plantas para sus programas de valoración como sea posible. Sólo pequeñas cantidades de material de la planta se requieren para los principales bioensayos in vitro que se usan comúnmente: si el extracto muestra actividad, usualmente menos de 500 g son necesarios para identificar los principios activos. Tales moléculas serán entonces candidatas para ser patentadas (Farsworth, 1994).

La dirección principal en el estudio de compuestos derivados de las plantas, desde un punto de vista industrial, es encontrar moléculas biológicamente activas con la intención de modificar las estructuras con el objeto de aumentar la actividad farmacológica o disminuir la toxicidad (Farsworth, 1994).

México tiene una vigorosa herencia de cultura prehispánica y es una nación con una medicina tradicional bien desarrollada, en el que las plantas medicinales son utilizadas ampliamente en diversas regiones del país. Durante la época colonial, la combinación de prácticas médicas tradicionales con conceptos y recursos médicos europeos produjo una riqueza compleja (Lozoya, 1994).

La información contemporánea acerca de las plantas medicinales de México fue escasa y desorganizada. Esta resultó de algunos estudios esporádicos de químicos y fisiólogos mexicanos en los 1940° y 1950°, que fueron influenciados por el descubrimiento de la diosgenina en el rizoma de Dioscorea mexicana (barbasco). Posteriormente, en los años setenta se renovó el interés por el estudio de la medicina indígena y las plantas medicinales utilizadas (Lozoya, 1994).

Colesterol y agentes hipocolesterolemiantes

Uno de los problemas de salud para el que se realizan varios estudios con plantas medicinales es el relacionado con la hipercolesterolemia, sobre todo por su participación en el desarrollo de aterosclerosis (Schmidt et al., 1993; Dunn y LeBlanc, 1994).

En muchas células animales el colesterol es tomado a través de endocitosis mediada por receptores (lipoproteínas de baja densidad o LDL) y de esta manera adquieren gran parte del colesterol que requieren para fabricar nuevas membranas. Si la incorporación es bloqueada, el colesterol se acumula en la sangre y puede contribuir a la formación de placas ateroscleróticas en las paredes de los vasos sanguíneos los depósitos de lípidos y tejidos fibrosos que causan parálisis y ataques de corazón por bloqueo del flujo sanguíneo (Alberts et al., 1994).

Los agentes hipocolesterolémicos son usados en el tratamiento de aterosclerosis para reducir la acumulación de colesterol; entre ellos se menciona al clofibrato, ergosterol producido por hongos, estigmasterol de Physostigma venenosum, el aceite de soya Glycine max, y el β -sitosterol ubicuo obtenido de aceite de germen de trigo, aceite de germen de centeno, aceite de maíz, aceite de semillas de algodón. Algunos de ellos ya se han comercializado (Lewis, 1992).

Debido a la relación entre los niveles de colesterol sérico y la incidencia de aterosclerosis, se ha hecho un gran esfuerzo en la identificación de entidades químicas que puedan disminuir el contenidos de lípidos en la sangre (Garduño et al., 1997).

Guatteria gaumeri

Guatteria gaumeri Greenman (Annonaceae), es un árbol del sureste de México, con distribución en Quintana Roo y Yucatán, principalmente. Mide de 7 a 15 m de altura, por 10 cm de diámetro, el tallo y las ramas están cubiertas con una corteza gris, las hojas son oval lanceoladas, acuminadas enteras y glabras, verde oscuras, de 9 a 11 cm de largo, con un peciolo de 8 mm, las flores son solitarias, blancas y de aproximadamente de 4 cm. El fruto es compuesto, redondo, con un diámetro de 2 cm (Martínez 1959; INI 1994) (Figura 1). Habita en clima cálido entre los 2 y los 34 msnm. Asociado a vegetación perturbada derivada de bosques tropicales caducifolios y subcaducifolios (INI, 1994). G. gaumeri es rica en todas sus partes en glándulas de aceite y cuando se tritura produce un olor aromático agradable.

Este árbol es conocido comúnmente como "elemuy" (del maya: ek'lemuy) o "yumel" y sus usos medicinales están asociados con la disminución del colesterol (hipercolesterolemia) y los cálculos biliares (colecistiasis), para el mal del riñón y como diurético. Se usa el cocimiento de la raíz y se toma por vía oral; la corteza y las hojas se emplean para deshacer los cálculos hepáticos, renales o vesiculares (colecistiasis), y también para la diabetes, leucorrea, gonorrea y pelagra (INI, 1994; Martínez, 1959). Existe



Guatteria gaumeri.
Annonaceae.

Figura 1. *Guatteria gaumeri* (Greenman). a. rama con inflorescencia, b. fruto.

además un preparado llamado yumel hecho a base de esta planta, que se usa contra los cálculos hepáticos y biliares (Martínez, 1959).

La corteza se encuentra a la venta en varios mercados del país, en donde también se expende en forma de tinturas. Estas son además exportadas, a granel o envasadas a diferentes países de Europa, Centro y Sudamérica (Chamorro *et al.*, 1993).

Los efectos hipolipidémicos del extracto alcohólico de *Guatteria gaumeri* se han reportado en seres humanos y animales; estos efectos han sido significativos, lo cual apoya el uso de la planta en este tipo de tratamientos (Tabla I).

α -ASARONA

Debido a las propiedades hipocolesterolémicas atribuidas a los extractos de *Guatteria gaumeri* en la medicina tradicional, se han realizado diversos estudios sobre las características de la corteza, las tinturas y los usos medicinales del extracto crudo. Se

ha examinado la fracción no polar de esta planta, de la que se aislaron tres propenilbencenos y asaraldehído además de la guattegaumerina. La α -asarona resultó ser el componente principal y mostró ser de gran importancia en las propiedades farmacológicas exhibidas por esta planta. La β -asarona no fue detectada (Enríquez et al, 1980; Leclercq et al, 1985).

La asarona (1-propenil-2,4,5-trimetoxi-benceno), PM = 208.25 se encuentra en la naturaleza como la mezcla de dos formas isoméricas, siendo la α -asarona el isómero (E) o trans, la β -asarona el isómero (Z) o cis. La asarona se aisló inicialmente de la raíz de Asarum europaeum (Aristolochiaceae) por destilación con agua. También se encuentra en los aceites etéreos de A. europaeum y A. arifolium y en el aceite de cálamo Acorus calamus (Araceae), donde fue obtenida junto con la forma isomérica β -asarona (Budavari 1989).

La forma cristalina de α -asarona se aisló a partir de la corteza de Guatteria guameri mediante la extracción con éter de petróleo y metanol. Posteriormente la extracción se llevó al cabo con hexano. Además de la α -asarona, se han aislado otros compuestos tales como el asaraldehído (trimetoxi-2,4,5 benzaldehído), transisolemicina [trimetoxi-1,2,3 (propenil-1)-5 benceno(E)], transisomiristicina [tetrametoxi 1,2,3,4 (propenil-1)-5 benceno (E)] y una bencilisoquinoleína, la guattegaumerina.

Recientemente se optimizó la síntesis de α -asarona con una recuperación de 90-95% (Díaz et al, 1990) y también se sintetizaron compuestos relacionados estructuralmente, derivados del 4-propenil-1,2-dimetoxibenceno 5-sustituidos con grupos MeO-, NO₂-, NH₂-, Cl-, e H-, cuyo cernimiento farmacológico mostró que algunos de ellos están provistos también de actividad hipolipídémica, aunque esta es menor a la mostrada por α -asarona (Díaz et al, 1993).

De los estudios de α -asarona en humanos se ha informado de algunos efectos hipocolesterolemiantes, aunque no se han especificado con detalle los resultados (Mandoki et al, 1980). También en animales y cultivos celulares la α -asarona ha mostrado diversos efectos genotóxicos y teratogénicos (Tabla I).

Tabla 1. Estudios realizados con *Gutteria gaureri*, α - y β -asarona.

Compuesto	Dosis	Organismo	Efectos	Referencias
G. gaureri, extracto alcoholico	0.25 ml	Hombres	Descenso en colesterol 14.9 y 17.9%.	Sánchez y Lerdo de Tejada, 1982.*
	NR	Mujeres	Descenso en colesterol 7.6 y 13%.	Ruiz, 1975.*
	0.025 mg/kg/día	Perro	Descenso en colesterol, triglicéridos y glucemia.	Sánchez <u>et al</u> , 1980; Lerdo de Tejada <u>et al</u> , 1980.*
	25-50 μ l/kg/día	Conejo	Descenso en colesterol 23 y 38 %, LDL 27 y 39%, HDL 11 y 29%.	Sánchez <u>et al</u> , 1985.*
	NR	Criceto	Disminución en glucemia.	Sánchez <u>et al</u> , 1986.*
	NR	Criceto	Disminución o desaparición de cálculos.	Tena <u>et al</u> , 1987.*
α -asarona	NR	Humanos	Hipocolesterolemia pronunciada.	Mandoki <u>et al</u> , 1980.
	10mg/ml	Hepatocitos	Formación de gotas intracitoplásmicas de triglicéridos; disminuyó secreción (67%) y síntesis de proteínas (67%).	López <u>et al</u> , 1993
	50mg/kg	Ratón	Prolongó sueño inducido por barbitúricos. Hipotemia. Protegió ante convulsiones inducidas.	Sharma <u>et al</u> , 1961.
	3mg/kg	Rata	Bloqueo de respuestas en fuga condicionada.	Dandiya y Henon, 1963.
	25 mg/kg	Rata	Afectó funciones olfatoria, auditiva y visual, y reflejo de enderezamiento en crías.	Chamorro <u>et al</u> , 1993.
	60, 300 mg/kg	Rata	Descenso en colesterol sérico 66%.	Mandoki <u>et al</u> , 1980.
	25mg/kg	Rata	Descenso en colesterol 56.3% y triglicéridos 61.3%.	Gómez <u>et al</u> , 1987.
	4, 10 y 25mg/kg	Criceto	Disminuyó cálculos biliares 64.2%.	

Tabla I. Estudios realizados con *Oxetaria gentrii*, α - y β -asarona (continuación).

Compuesto	Dosis	Organismo	Efectos	Referencias
α -asarona	50 μ g/ml	Hepatocitos	Inhibió secreción y síntesis de lípidos.	Hernández <u>et al.</u> , 1993.
	10 μ g/ml	Hepatocitos	Cambios ultraestructurales, disminución en síntesis de proteínas.	López <u>et al.</u> , 1993.
	50-75 mg/kg	Rata	Toxicidad materna, embriotoxicidad y teratogenia.	Jiménez, <u>et al.</u> , 1988.
	60 mg/kg	Ratón	Teratogenia, toxicidad materna y embriotoxicidad.	Salazar, <u>et al.</u> , 1992.
	NR	<i>S. typhimurium</i>	Mutagénica en línea TA100.	Mohar <u>et al.</u> , 1986.*
	150-210 μ g/ml	Linfocitos humanos	Aumento en ICHs <u>in vitro</u> .	Morales <u>et al.</u> , 1992.
	25-100 μ g/ml	Celulas modula osea de ratón.	Aumento en ICHs <u>in vivo</u> .	
	NR	Hepatocitos	Inducción de síntesis no programada de DNA.	Tsai <u>et al.</u> , 1994.
	250 ppm	<i>Tradescantia</i>	Aumento en micronúcleos.	Ruiz <u>et al.</u> , 1996.
	180, 210 y 250 μ g/ml	<i>Allium cepa</i>	Aumento en micronúcleos, inhibió la división mitótica.	Ruiz <u>et al.</u> , 1997.
NR	<i>Toxocera canis</i>	Inhibió la movilidad y tuvo actividad neotática.	Sugimoto <u>et al.</u> , 1995.	
β -asarona	4.7 y 0.25 μ m/g	Ratón	Inducción de hepatomas.	Wiseman <u>et al.</u> , 1987.
	NR	<i>S. typhimurium</i>	Mutagénica en línea TA100 + 69.	Cöggelman y Schinner, 1987.
	NR	Linf.humanos	Aumento en ICHs.	Abel, 1987.*
	50 mg	Ratón	Potenció acción letal de metrazol, potenció la acción de picrotoxina.	Sharma <u>et al.</u> , 1961.

NR = no reportado * = reportado en Chamorro et al., 1993.

Los datos obtenidos en cultivo de hepatocitos, indican que el efecto hipolipidémico del compuesto puede deberse a inhibición de la síntesis y la secreción de lipoproteínas o probablemente al incremento en su catabolismo. El efecto de α -asarona en la secreción de lípidos en los hepatocitos es más fuerte que la de probucol y clofibrato, dos fármacos hipolipidémicos ampliamente usados, los resultados sugieren que la α -asarona puede ser un agente hipolipidémico más potente (Hernández et al., 1993). La incorporación de ácido oleico [14 C] en los triglicéridos celulares se incrementó considerablemente (más de 3.2 veces) en presencia de α -asarona, de acuerdo con los datos morfológicos que mostraron incremento en las gotas lipídicas intracitoplásmicas, constituidas principalmente de triglicéridos. La acumulación de triglicéridos pudo ser debida principalmente a una disminución en su secreción y no a un incremento en su síntesis, ya que la actividad de la enzima glicerol 3-fosfato deshidrogenasa (GPD) fue inhibida. Se sugirió que el efecto de α -asarona sobre la secreción de lípidos puede ser debido a: 1) la inhibición de síntesis de lípidos necesarios para el ensamblado de lipoproteínas, como sugieren los experimentos de incorporación y determinaciones enzimáticas, 2) inhibición de la síntesis de apoproteínas, como sugiere la evidencia preliminar que muestra una drástica disminución en los niveles de apo A1 mRNA después de una y dos semanas de exposición a α -asarona, o 3) inhibición de la síntesis o secreción de proteínas como muestran los experimentos de marcaje de proteínas totales con leucina [3 H] (Hernández et al., 1993, Garduño et al., 1997).

La α -asarona también mostró mejores efectos que el clofibrato en tratamientos de hipercolesterolemia en ratas con una disminución tres veces mayor en una relación dosis-efecto (Gómez et al., 1987).

Los resultados observados en la disminución de lípidos en el hombre y en animales, apoyan la efectividad de los extractos de Guatteria guameri en pacientes hipercolesterolémicos (Garduño et al., 1997).

La toxicidad aguda de α -asarona se ha determinado en roedores principalmente (Tabla II). En comparación, la β -asarona presenta valores de DL₅₀ menores tanto en ratas (122 mg/kg) como en ratones (184 mg/kg), lo cual sugiere que es más tóxica que la forma alfa (Chamorro et al., 1993).

Tabla II. Toxicidad de asaronas por vía intraperitoneal.

Isómero	Organismo	DL50 (mg/kg)	Referencia.
α -asarona	Rata	300	Chamorro <u>et al.</u> , 1993.
α -asarona	Cobayo	275	"
α -asarona	Ratón	225, 245	"
α -asarona	Ratón	250	Morales <u>et al.</u> , 1992.
β -asarona	Rata	122	Chamorro <u>et al.</u> , 1993.
β -asarona	Ratón	184	"

En estudios realizados en hepatocitos de rata, se encontró que la exposición a α -asarona (1-50 μ g/ml) durante una y dos semanas, produjo alteraciones morfológicas y ultraestructurales, aumento en el número y tamaño de gotas intracitoplasmáticas de lípidos, y a las concentraciones más elevadas (25-50 mg/ml), retracción de los cordones de hepatocitos y desprendimiento de las células de las cajas de cultivo (muerte celular) (López et al., 1993; Chamorro et al., 1993).

En estudios farmacocinéticos de asarona en conejo, a los cuales se les administró por vía intravenosa 5, 10 o 20 mg/kg, se observó una rápida distribución del compuesto seguida de una fase de eliminación más lenta (Tsai et al., 1991).

Se han reportado algunos efectos teratogénicos de α -asarona en rata y ratón (Jiménez et al., 1988; Salazar et al., 1992) (Tabla I), sin embargo, en embriones de pollo, la α -asarona no produjo efecto teratogéno con dosis de 0.4 a 4.0 mg/huevo (Chamorro et al., 1993).

Los estudios genotóxicos han revelado actividad significativa de la α -asarona en Salmonella, en sistemas celulares de mamíferos in vitro y en plantas (Tabla I) (Ruiz et al., 1996; Ruiz et al., 1997). Sin embargo, en un estudio de dominantes letales en ratas, no hubo cambios en la frecuencia testigo, indicados por la muerte pre y postimplantación. La α -asarona mostró una respuesta mutagénica en la prueba de Ames en Salmonella typhimurium TA100, y en la crina de ratas alimentadas con este agente mostraron derivados glucurónicos en líneas TA100 y UTH 8414 (Morales et al., 1992). Los resultados mostrados sugieren que la α -asarona es ligeramente citotóxica y genotóxica tanto in vivo e in vitro.

En estudios sobre la conducta de crías, después de la administración pre y postnatal de la droga a ratas gestantes, se observó que la dosis de 25 mg/kg afectó ligeramente las funciones olfatoria, auditiva y visual, así como el reflejo de enderezamiento (Chamorro et al., 1993).

La forma isomérica β -asarona, el componente principal del aceite de cálamu (Acorus calamus), indujo tumores mesenquimatosos en el intestino delgado de ratas, y la α -asarona mostró una actividad comparable (Wiseman et al., 1987). También se ha reportado que β -asarona es mutagénica, en presencia de fracción S9, en el sistema de Salmonella typhimurium TA100 (Göggelmann y Schimmer 1983; Chamorro et al., 1993).

El efecto de las asaronas en el patrón de comportamiento espontáneo fue estudiado en 8 gatos. Ambos isómeros redujeron la sociabilidad. Por otra parte, experimentos de perfusión en corazón de rana revelaron que tanto α -asarona como β -asarona causaron detención del corazón en diástole a muy baja concentración. También α -asarona y β -asarona mostraron tener acciones anti-acetilcolina siendo β -asarona la más potente (Sharma et al., 1961).

Las diferencias en algunas de las acciones de estos dos compuestos, que poseen la misma estructura química y difieren sólo en la configuración, puede ser debido a la dificultad de α -asarona para actuar en los sitios receptores que pueden ser ocupados en algún momento por la β -asarona (Dandiya y Menon, 1963).

Los resultados toxicológicos señalan un riesgo en la ingestión de Guatteria guamori y α -asarona para el ser humano, que es necesario evitar. Existe la posibilidad de que los análogos sintéticos pudieran estar exentos de toxicidad, para lo cual es necesario que se lleven al cabo, los estudios preclínicos de seguridad y relación estructura-actividad de los compuestos, que forman parte del proceso de introducción de nuevas entidades farmacológicas en medicina (Chamorro et al., 1993). Por otra parte es importante considerar el análisis de los efectos de los compuestos que se evalúan ante otras entidades químicas, para estudiar las posibles interacciones que puedan tener con otros compuestos, principalmente aquellos que promueven la actividad metabólica de los organismos expuestos.

Para cualquier investigación de plantas con actividad biológica es importante utilizar los bioensayos apropiados para monitorear los efectos requeridos relacionados con los principios activos obtenidos, ya que, aunque muchos han resultado útiles en medicina, algunos producen efectos deletéreos como dolencias y sensibilización o incluso, han resultado ser mutagénicos, carcinogénicos o teratogénicos (Hostettmann et al., 1995).

Los estudios basados en bioensayos para separar e identificar compuestos activos surgieron en los 1980^a a partir del trabajo de grupos de investigación que decidieron experimentar con extractos de plantas totales, productos crudos y fracciones cromatográficas ensayándolos en las pruebas biológicas estándar (Lozoya 1994).

Los estudios de la actividad genotóxica de los agentes químicos que representan un riesgo mutagénico y/o carcinogénico para los seres humanos se han modificado en los últimos quince años y cada día tienen más importancia, pues las evidencias experimentales indican que existe una asociación muy fuerte entre la actividad recombinogénica de las sustancias químicas y la carcinogénesis; además, el inicio de un proceso canceroso frecuentemente está en relacionado con cambios en la información genética de las células (Ames et al., 1973; Clayson, 1980; Vogel et al., 1980; Radman y Kinsella, 1980; Cairns 1981; Graf et al., 1984).

El empleo de los diversos bioensayos se enfoca hacia dos direcciones principales: la determinación del riesgo potencial que implica la exposición a los agentes en cuestión, tanto en relación con las células germinales como con las somáticas, y la predicción de la asociación entre genotoxicidad y carcinogenicidad, además del estudio de los posibles mecanismos de acción. Los sistemas de prueba ideales deben ser sencillos, rápidos, reproducibles y económicos, y tener suficiente sensibilidad para la detección de actividad a bajas concentraciones. Por lo anterior es esencial elegir entre los posibles organismos blanco: organismos inferiores (microorganismos, insectos, crustáceos, moluscos), sistemas subcelulares aislados (enzimas, receptores, organelos), células cultivadas humanas o de origen animal (De Serres, 1979; Vogel y Natarajan, 1979a y b; Todd et al., 1983; Würgler et al., 1983a; Brusick, 1988; Hostettmann et al., 1995).

Drosophila melanogaster

Uno de los organismos que ha sido utilizado constantemente como bioensayo en la valoración de mutagenicidad es la mosca de la fruta Drosophila melanogaster. Este insecto reúne una serie de características que le hacen un sistema de prueba eficiente para detectar el daño de agentes químicos y físicos en el DNA.

El manejo y el mantenimiento de Drosophila melanogaster es sencillo. Su ciclo de vida incluye un período de embriogénesis dentro del huevo y una sucesión de tres estadios larvarios que culminan con una metamorfosis completa de la que finalmente surge el adulto; la duración del ciclo de vida completo es de 9.5 a 10 días en condiciones controladas de temperatura (25°C) y humedad relativa (60%) (Demerec y Kaufmann, 1962; Ramos et al., 1993). La duración del ciclo de vida permite el análisis de prole numerosa, y la aplicación de exposiciones crónicas, agudas y fraccionadas. Drosophila cuenta con una gran cantidad de marcadores fenotípicos que facilitan el análisis de eventos genéticos mediante el sistema de cruces (Lindsley y Grell, 1968; Lindsley y Zimm, 1979). Los agentes en estudio pueden administrarse por diferentes

vías tales como alimentación de larvas y adultos, inyección, inhalación y ducha vaginal.

Drosophila es un modelo in vivo, por lo que no requiere la adición de un sistema metabólico exógeno y tiene un amplio espectro de actividades metabólicas capaces de activar promutágenos y procarcinógenos, siendo eficiente en la detección de sustancias de vida media corta. En este organismo se ha demostrado la presencia de sistemas enzimáticos de citocromo P-450 que ha mostrado rutas de desintoxicación similares a las de los mamíferos (Zijlstra, 1987; Timbreil 1989), y las células germinales tienen metabolismo oxidativo en ciertos estados de su maduración (Baars et al, 1980; Clark, 1982; Hällström et al, 1982; Zijlstra y Vogel, 1988).

Prueba de mutación y recombinación somáticas (SMART)

El empleo de las células somáticas de Drosophila en los sistemas de prueba permite detectar la actividad mutagénica y/o recombinogénica de los compuestos químicos. Dada la correlación que existe entre la actividad mutagénica y la carcinogénica, se ha propuesto que la prueba de mutación y recombinación somática (SMART) además de detectar agentes mutagénicos, puede emplearse para identificar compuestos con potencial carcinogénico, los cuales inducen recombinación mitótica en una proporción importante (Graf et al, 1984; Delgado, 1990; Ordaz, 1991, Rodríguez y Ramos, 1992).

En esta prueba se tratan los discos imagales de las larvas que dan origen a las alas del adulto (Figura 2), si el tratamiento con los compuestos a probar induce alguna alteración en el DNA de las células, ésta alteración se transmite por mitosis a las células hijas durante la metamorfosis (Crick y Lawrence 1975; Ramos et al, 1993).

En el protocolo de la prueba de mutación y recombinación somáticas que utiliza las alas se usan marcadores fenotípicos recesivos que afectan los tricomas de las células epiteliales. la inducción de alguna alteración produce la formación de un clon celular por divisiones mitóticas sucesivas, observable como una mancha de células afectadas rodeadas por un contexto de células

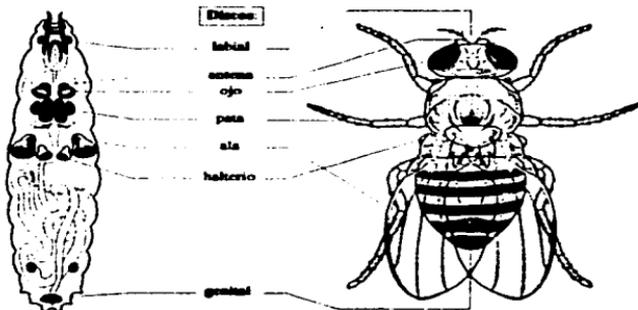


Figura 2. Estructuras formadas a partir de los discos imagales de la larva de *Drosophila*.

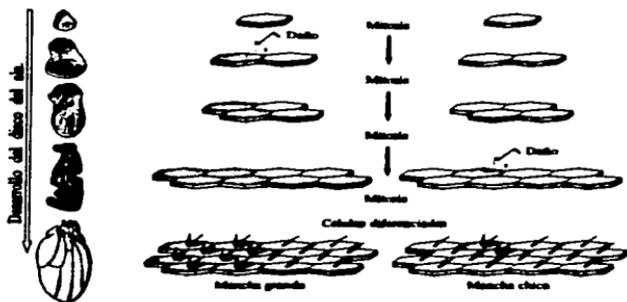


Figura 3. SMART detecta la formación de clones inducidos por daño genético, en el desarrollo del disco imagal del ala.

normales en la superficie del ala (Figura 3). El tamaño de la mancha producida puede ser un indicador del número de divisiones celulares y/o del tiempo durante el desarrollo en que ocurrió la alteración, por lo que se pueden distinguir compuestos de acción directa y compuestos que requieren ser biotransformados por parte del organismo para producir el daño; estos últimos actúan en etapas tardías del desarrollo produciendo clones celulares de tamaño pequeño (García-Bellido y Merriam, 1971a y b; Baars et al 1980, Wright 1980, Würigler et al 1983b, Graf et al 1984, Vogel 1987, Zijlstra y Vogel, 1988).

El marcador flare, fir' (3-39.0) es una mutación letal recesiva que se expresa en células somáticas produciendo alteraciones en los tricomas dando el aspecto de una flama o como manchas quitinosas sobre la superficie de las alas. Este marcador se reconoce por la presencia del gen dominante Ser (Serrata) que es letal en condición homocigótica. Este arreglo genético se mantiene con el cromosoma balaceador TM3 el cual porta numerosas inversiones que impiden el entrecruzamiento entre cromosomas homólogos. De esta manera, en cada generación se eliminan las moscas fir'/fir' y Ser/Ser, por lo que sólo se recuperan las heterocigotas (Delgado, 1990).

La mutación multiple wing hairs, mwh (3-0.0) es recesiva y produce la aparición de tres o más tricomas por célula en lugar de uno, como en la expresión silvestre (Graf et al, 1984).

Las alteraciones detectadas en SMART pueden originarse por varios eventos: mutación, delección, pérdida cromosómica o recombinación, y se expresan como manchas sencillas con uno u otro de los fenotipos mwh o fir'. Un evento de recombinación entre mwh y fir' puede dar como resultado una mancha sencilla mwh. Sin embargo la recombinación entre fir' y el centrómero (3-47.7), da lugar a manchas gemelas mwh/fir', debido a lo anterior, las manchas gemelas permiten diferenciar la actividad de compuestos recombinogénicos (Graf et al, 1984) (Figura 4).

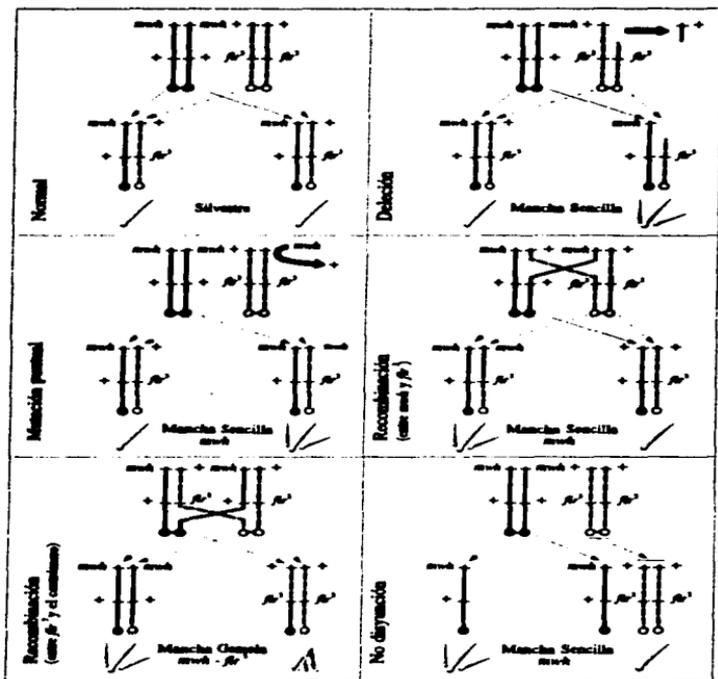


Figura 4. Eventos genéticos detectables en SMART (Modificado de Graf et al., 1984).

Algunos compuestos de amplio uso en pruebas de genotoxicidad han sido denominados de manera general como mutágenos de referencia. Estos compuestos han mostrado efectos claramente positivos en los diferentes sistemas y se conoce gran parte de su actividad genotóxica y los mecanismos por los que son biotransformados por los seres vivos, debido a esto, se emplean en la comparación de compuestos con actividad similar o en pruebas de antagonismo, actividad sinérgica o bien para evaluar compuestos con actividad antimutagénica.

La N-nitroso-dimetilamina [(CH₃)₂ NNO] es un compuesto alquilante que requiere activación metabólica (promutágeno) y es un carcinógeno potente. Induce tumores en diferentes partes del organismo según sea la ruta de administración. En las células germinales de Drosophila melanogaster indujo genes letales recesivos ligados al sexo y pérdida cromosómica (Vogel y Natarajan 1979a y b). En SMART, tanto en los ojos como en las alas, induce todos los tipos de manchas a concentraciones que van desde 0.5 a 50 mM (Delgado 1990; Ordaz 1991; García et al., 1991).

La prueba de mutación y recombinación somáticas de Drosophila melanogaster ha demostrado ser un buen modelo de prueba en la evaluación de agentes con potencial genotóxico, por ejemplo, metales pesados y compuestos orgánicos (Abundis 1996; Ramos 1994; Maldonado 1994), además de la interacción entre diferentes compuestos o mezclas (Orozco 1993; Gaytán 1993) y la actividad genotóxica o protectora de algunas plantas medicinales o sus derivados (García et al., 1991; Muñoz 1994, Martínez et al., 1996).

En este trabajo se realizaron pruebas de genotoxicidad relacionadas con la evaluación de sustancias químicas derivadas de plantas con actividades farmacológicas importantes, y que pueden tener aplicación en sistemas terapéuticos en seres humanos. Los efectos favorables del uso de la planta Guatteria gaumeri, su principio activo, α -asarona, y los derivados sintéticos de esta última determinaron el planteamiento de los objetivos de este trabajo.

OBJETIVOS

Objetivo general:

Determinar el potencial genotóxico de la α -asarona y cinco compuestos análogos en células somáticas de Drosophila melanogaster.

Objetivos particulares:

1. Comparar la frecuencia de manchas/ala inducida por los compuestos en células somáticas de Drosophila.
2. Comparar la frecuencia de recombinación inducida por los compuestos en células somáticas de Drosophila.
3. Determinar si los compuestos seleccionados tienen potencial protector del daño genético inducido por un mutágeno de referencia.
4. Clasificar los compuestos seleccionados con base en su potencial protector del daño genético inducido.
5. Determinar el potencial genotóxico de la corteza de Guatteria sp. en la prueba de manchas en las alas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Compuestos utilizados

La α -asarona (trans-1-propenil-2,4,5-trimetoxi-benceno) y cuatro compuestos análogos sintéticos fueron proporcionados por el Dr. Joaquín Tamariz de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional. Los cuatro análogos son derivados de 4-propenil-1,2-dimetoxibenceno 5-sustituidos y fueron designados con un número de acuerdo a la clave de síntesis, varían estructuralmente en la presencia de sustituyentes ceto e hidroxilo (en la cadena) y cloro, nitro y amino (en la posición 5 del anillo de benceno) (Figura 5).

La β -asarona (cis-1-propenil-2,4,5-trimetoxi-benceno) fue obtenido de Sigma, St. Luis Mo. [CAS. 5273-86-9].

La N-Nitroso-dimetilamina, (CH₃)₂-NNO (DMN), se obtuvo de Sigma [CAS. 62-75-9].

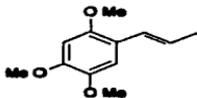
Los compuestos se disolvieron en una mezcla 3:1 de etanol (3%) y Tween 80 (1.5%), y los tratamientos de 48 h se dieron en medio instantáneo para Drosophila (Carolina Biological Supply).

Líneas de Drosophila

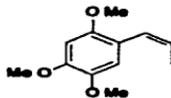
Los cultivos se mantuvieron a 25°C, 60% de humedad relativa y en medio de cultivo elaborado a base de: agua (82.56%), carragenina (0.99%), azúcar (4.62%), harina de maíz (6.94%), levadura (4.36%), ácido propiónico (0.26%) y nipagin (0.26%) (Ramos *et al.*, 1993).

Se utilizaron líneas de Drosophila melanogaster para la cruz estándar: hembras vírgenes flr'/TM3,Ser y machos mwh/mwh. De esta cruz se obtienen larvas transheterocigas para los marcadores de los tricomas (+ flr'/mwh +) (libres de inversión) y larvas portadoras del cromosoma balanceador (TM3,Ser/mwh +), estas últimas se reconocen en el estado adulto por la expresión del gen Ser.

Debido a que en SMART existe una clara correlación entre el tiempo de inducción y frecuencia, así como el tamaño de las manchas sencillas, en este trabajo se emplearon larvas de 72 ± 4 h de edad, ya que en ellas se inducen manchas de tamaño y proporción adecuados para realizar el análisis de los compuestos a probar (Graf 1995).

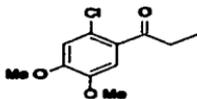


α -asarona

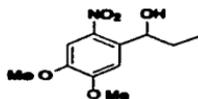


β -asarona

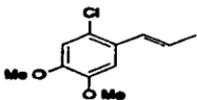
2,4,5-trimetoxi propenil benceno



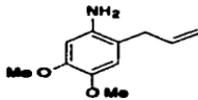
compuesto 2



compuesto 6



compuesto 7



compuesto 11

Figura 3. Fórmulas estructurales de los análogos de asarona.

Protocolo 72 x 48 h.

Para evaluar la genotoxicidad de los compuestos se utilizaron larvas de 72 : 4 h de edad, las cuales se recuperaron del medio de cultivo por el método de Nöttinger (1970), que consiste en hacer flotar a las larvas en una solución concentrada de sacarosa, la que entonces se coloca en un embudo de separación.

Las larvas se colocaron por grupos de 50 - 150 en tubos homeopáticos que contenían 1 g de medio instantáneo para Protophila (Carolina Biological Supply) y 5 ml de solución de cada uno de los compuestos a probar. En estos tubos se dejó que los organismos completaran su desarrollo para una exposición total de 48 h (Figura 6a).

Las concentraciones usadas fueron las siguientes:

En el ensayo preliminar de α -asarona se probaron las concentraciones de 125, 250, 500 y 1,000 ppm.

Posteriormente la α -asarona y los cuatro análogos se probaron a las concentraciones de 50, 75, 100, 125 y 150 ppm.

Por otra parte se realizaron experimentos con el isómero β -asarona (el cual ha sido reportado previamente como un carcinógeno potencial) para comparar su genotoxicidad con la de los compuestos análogos. La β -asarona se administró a concentraciones de 18.5, 46.25, 92.5, 185 y 370 ppm.

Siendo la α -asarona el principio activo de la corteza del yumel (Guatteria guameri) también se hicieron experimentos con una infusión acuosa (1 g de corteza en 50 ml de agua), al 100 y 50% de la planta Guatteria sp. para probar su actividad.

Para cada serie experimental se corrieron los lotes testigos de etanol + Tween 80, y agua destilada en el caso de las infusiones.

Protocolo 72 x 6 x 48 h.

Dados los antecedentes farmacológicos de la α -asarona y sus efectos relacionados con algunos procesos metabólicos, como la inhibición de síntesis de lípidos y proteínas, se realizaron ensayos para determinar si los compuestos probados interferían con

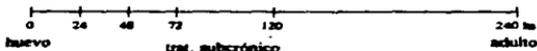
el daño inducido por el agente alquilante indirecto (que requiere activación metabólica) N-Nitroso-dimetilamina (DMN).

Larvas de 72 ± 4 h de edad se expusieron de forma aguda (6 h) a DMN (925 ppm) colocándolas en tubos homeopáticos que tenían un extremo cubierto por una gasa de nylon y el otro por un tapón de poliuretano, los cuales se pusieron en contacto con el mutágeno de referencia. Después las larvas se enjuagaron en agua corriente y se transfirieron a tubos que contenían medio instantáneo (Carolina) y 5 ml de solución con α -asarona o los compuestos análogos (50 y 100 ppm) en los que permanecieron hasta completar su desarrollo (48 h, tratamiento subcrónico), de esta manera la exposición total fue de 6 x 48 h (Figura 6b).

Con la corteza de Guatteria se llevó al cabo el mismo procedimiento, utilizando en este caso las infusiones preparadas como se mencionó anteriormente.

a) PROTOCOLO PARA GENOTOXICIDAD: 72 ± 48 h.

- Larvas de 72 ± 4 h de edad heterocigas para marcadores fenotípicos del ala, expuestas durante 48 h a los compuestos de prueba.



b) PROTOCOLO PARA INTERACCIÓN: 72 ± 6 x 48 h.

- Larvas heterocigas de 72 ± 4 h de edad expuestas en forma aguda (6 h) a un mutágeno de referencia (DMN). Posteriormente se enjuagan y se exponen por 48 h a los compuestos seleccionados.

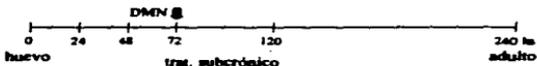


Figura 6. Protocolos utilizados en SMART.

Fijación y elaboración de preparaciones

Las moscas adultas que emergieron de los tratamientos fueron separadas de acuerdo a su fenotipo, libres de inversión (alas silvestres) y portadoras del cromosoma balanceador (alas Serrata). Las moscas se fijaron en etanol al 70%. Las alas se disecaron del cuerpo de las moscas con pinzas de relojero y se colocaron por pares en portaobjetos con solución Fauré (30 g de goma arábiga, 20 ml de glicerol, 50 gr de hidrato de cloral y 50 ml de agua) para su análisis posterior al microscopio compuesto a 40x (Graf et al., 1984; Gaytán, 1993). Las manchas mwh o flr se clasifican en tres categorías: chicas sencillas (de 1 ó 2 células), grandes sencillas (más de 2 células) y gemelas (manchas que muestran la presencia de los dos marcadores en células adyacentes (Graf et al., 1984)).

Análisis estadístico

Para cada experimento se realizaron al menos dos repeticiones, y el análisis del efecto se hizo sobre 80 - 120 alas por tratamiento. El procesamiento de los datos y el análisis estadístico se realizó empleando el programa de cómputo SMART (Frei y Würigler, 1988, no publicado) basado en la prueba no paramétrica de χ^2 y con un valor de $P = 0.05$.

Mediante este programa se determina si la frecuencia de manchas sencillas y gemelas obtenidas posterior a los tratamientos, se incrementa cuando se compara con los testigos correspondientes (Frei y Würigler, 1988). La comparación de las frecuencias obtenidas se basa en la confrontación de dos hipótesis:

- 1) H_0 , la frecuencia de mutación (f_e) (inducida + espontánea) no es mayor que la frecuencia de mutación del grupo testigo (f_c), $f_e = f_c$.
- 2) H_a , la frecuencia experimental es igual a m veces la frecuencia testigo (f_c), donde m es el factor de multiplicación para las frecuencias experimentales de los diferentes tipos de manchas. Para manchas sencillas chicas y totales $m = 2$ y para sencillas grandes y gemelas $m = 5$, ya que éstas son mucho menos frecuentes que las primeras, $f_e = m \times f_c$.

Este análisis permite decidir si la frecuencia de manchas inducidas en los tratamientos tienen un diagnóstico positivo, débil positivo, negativo o indeterminado para eventos de mutación y/o recombinación de los compuestos (Frei y Würgler, 1988).

Por otra parte se utilizó la prueba no paramétrica de comparaciones múltiples (U de mann-Whitney-Wilcoxon) para la sobredispersión en el número de manchas por mosca y el número de células por clon, $\alpha = 0.05$. La prueba de U aplicada a la dispersión poblacional contribuye a la toma de decisiones sobre la genotoxicidad de los compuestos evaluados en SMART (Frei y Würgler, 1995; Ramos et al., 1996, Zar, 1983).

RESULTADOS

Para cada compuesto o combinación se muestran primero los resultados en cuanto al número de manchas por ala, posteriormente se analiza la distribución de las manchas por su tamaño y finalmente la distribución del número de manchas por mosca.

α -Asarona. Para determinar las concentraciones que se emplearon en este trabajo, se realizó una prueba preliminar con α -asarona y el bioensayo a las concentraciones de 125, 250, 500 y 1,000 ppm (Tabla III y Figura 7a). La α -asarona indujo manchas simples chicas ($P < 0.05$) en la concentración de 125 ppm y a concentraciones mas altas resultó tóxica, reflejado esto en una menor recuperación de organismos adultos, aunque no hubo genotoxicidad aparente a estas concentraciones. Al analizar la distribución de las manchas por el número de células que las forman se encontraron manchas de mayor tamaño a partir de 125 ppm, además de que la distribución típica se modificó aunque no de manera significativa ($P > 0.05$) (Fig. 7b). Con respecto al número de manchas por mosca no se observó un patrón sensiblemente diferente al del testigo correspondiente (Figura 7c).

Con base en los resultados anteriores se eligieron concentraciones mas bajas para probar a la α -asarona y sus análogos, siendo éstas: 50, 75, 100, 125 y 150 ppm. Los datos obtenidos mostraron que la α -asarona indujo manchas grandes a 100 ppm ($P < 0.05$) (Tabla IV y Fig. 8a). El tamaño de las manchas obtenidas fue mayor al de las del lote testigo a partir de 50 ppm aunque esta diferencia no fue significativa (Fig. 8b). El análisis mediante la U de Mann-Withney mostró diferencias significativas en la distribución del número de manchas por mosca entre el tratamiento con 125 ppm y los tratamientos con 75 y 100 ppm, sin embargo, ninguno de los tratamientos fue diferente con respecto al lote testigo. En el resto de las comparaciones no hubo diferencias con respecto al lote testigo (Fig. 8c).

El tratamiento previo con 50 y 100 ppm de la α -asarona no modificó la frecuencia de manchas, el número de células por mancha

ni el número de manchas por mosca inducidas por el agente alquilante N-Nitroso-dimetilamina (Tabla V y Figura 9a-c).

Compuesto 2. En los tratamientos con el compuesto 2, no se incrementó la frecuencia de manchas a ninguna de las concentraciones probadas (Tabla VI y Figura 10a), sin embargo el tamaño de las manchas obtenidas fue ligeramente mayor en las series experimentales (Figura 10b), aunque sin alcanzar un efecto significativo. En relación con el número de manchas por mosca no se observaron diferencias entre las series experimentales y el testigo correspondiente (Figura 10c).

Al igual que en el tratamiento anterior, el tratamiento previo con 50 y 100 ppm no modificó la genotoxicidad de la DMN (Tabla VII y Figura 11a-c).

Compuesto 6. En todas las series experimentales de este compuesto la frecuencia de manchas totales fue mayor al del lote testigo (Tabla VIII y Figura 12a), sin embargo, sólo resultó significativo para manchas grandes a 125 ppm. La distribución del número de células por mancha indicó que en todas las concentraciones se obtuvieron manchas mayores al testigo (Figura 12b), aunque sólo se encontraron diferencias significativas entre la distribución de la serie tratada con 50 ppm y el testigo. También se observaron más manchas por mosca que en el testigo (excepto a 125 ppm), aunque nuevamente el efecto no fue significativo (Figura 12c).

Las moscas tratadas previamente con 50 y 100 ppm mostraron una frecuencia de manchas similar a la inducida por la DMN, así como una distribución semejante del número de células por mancha (Tabla V y Figura 13a y b); sin embargo, la distribución del número de manchas por mosca mostró una mayor proporción de organismos con manchas supernumerarias sobre sus alas en las moscas tratadas previamente con el compuesto 6, en comparación con las que sólo se trataron con la DMN (Figura 13c), sin embargo la diferencia no alcanzó a ser significativa.

Compuesto 7. Los tratamientos con el compuesto 7 no incrementaron la frecuencia de manchas a ninguna de las concentraciones probadas (Tabla IX y Figura 14a). La distribución del número de células por mancha fue ligeramente diferente en las series tratadas ($P > 0.05$) (Figura 14b). El número de manchas por mosca fue similar en las series experimentales y el testigo correspondiente (Figura 14c).

La previa exposición al compuesto 7 incrementó ligeramente pero en relación con la concentración la frecuencia de manchas por mosca inducida por la DMN (Tabla VII y Figura 15a), pero no alteró la distribución del número de células por mancha (Figura 15b). El tratamiento previo con 100 ppm modificó la distribución del número de manchas por mosca con respecto al tratamiento con 50 ppm y el testigo positivo ($P < 0.05$), obteniéndose en general más manchas por organismo (Figura 15c).

Compuesto 11. El compuesto 11 no incrementó a ninguna de las concentraciones probadas la frecuencia de manchas del lote testigo (Tabla X y Figura 16a), sin embargo, se obtuvieron manchas de mayor tamaño en las moscas tratadas con 50, 75 y 100 ppm (Figura 16b), encontrándose diferencias significativas entre la series experimentales correspondientes a 75 y 125 ppm. La distribución del número de manchas por mosca fue similar a la del testigo (Figura 16c).

La exposición previa a este compuesto no modificó la genotoxicidad de la DMN (Tabla VII y Figura 17a-c).

β -Asarona. La β -asarona mostró una clara actividad en la inducción de todos los tipos de manchas: chicas y grandes a 185 y 370 ppm, gemelas a 185 ppm y totales a 46.25, 185 y 370 ppm (Tabla XI y Figura 18a). A su vez, el análisis de manchas por mosca y el de células por clon indican diferencias significativas entre las concentraciones probadas, principalmente con las concentraciones de 185 y 370 ppm (Figuras 18b y c).

Guatteria sp. En el caso de las infusiones de Guatteria sp., los resultados fueron significativos para manchas chicas (infusión al 100%), grandes (50%) y totales para ambas (Tabla XII y Figura 19a). La prueba de U fue significativa en la sobredispersión de células por cion para la dilución al 50% (Figura 19b). No se observó alteración en el número de manchas por mosca (Figura 19c).

En el análisis de la interacción de las infusiones de Guatteria con el agente alquilante N-Nitroso-dimetilamina, la infusión a 100% modificó la distribución del número de células por mancha (Tabla XIII y Figura 20a-c).

Tabla III. Frecuencia de manchas inducidas por α -asarona en las alas de Drosophila melanogaster. Exposición: 72 x 48 hs. Experimentos preliminares.

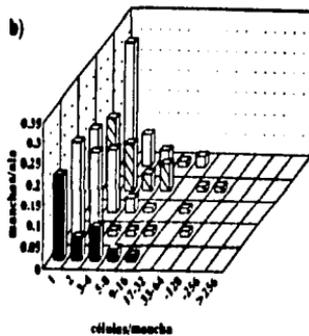
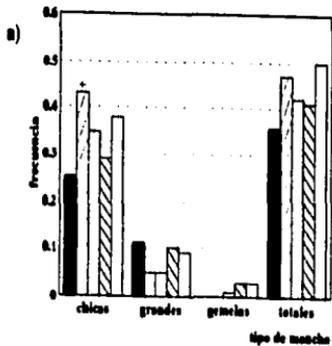
Conc. [ppm]	No. de alas	Manchas ocelillas chicas $n = 2$	Manchas ocelillas grandes $n = 5$	Manchas genales $n = 5$	Manchas totales $n = 2$	Clonaje <u>mh</u>	Ciclos de división celular promedio	Frec. de formación de clonaje $\times 10^{-3}$	
		No. (fr)	No. (fr)	No. (fr)	No. (fr)			Obs.	-test.
Test.	80	20 (0.25)	9 (0.11)	0 (0.00)	29 (0.36)	26	1.69	1.3	
125	80	34 (0.43)*	4 (0.05)	0 (0.00)	38 (0.47)	37	1.81	1.9	0.6
250	79	28 (0.35)	4 (0.05)	1 (0.01)	33 (0.42)	30	1.67	1.6	0.2
500	80	23 (0.29)	6 (0.10)	2 (0.03)	33 (0.41)	32	2.06	1.6	0.3
1000	76	29 (0.38)	7 (0.09)	2 (0.03)	38 (0.50)	37	1.92	2.0	0.7

Análisis estadístico de acuerdo a Frei y Wirgler (1988).

Test. = Ktanol + Tween 80 (3:1) 4.5%.

* = positivo, - = negativo, i = indeterminado.

Niveles de probabilidad: $\alpha = \beta = 0.05$.



α -asarona [ppm]



a) Frecuencia de manchas

b) Células/mancha

c) Manchas/mosca

Figura 7. Resultados obtenidos con α -asarona. Tratamiento: 72 x 48 h.

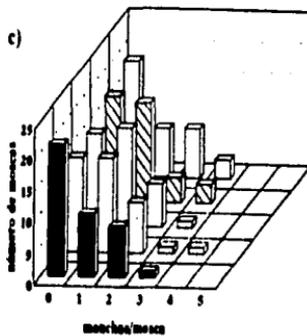


Tabla IV. Frecuencia de manchas inducidas por α -asarona en las alas de Drosophila melanogaster. Exposición: 72 x 48 hs.

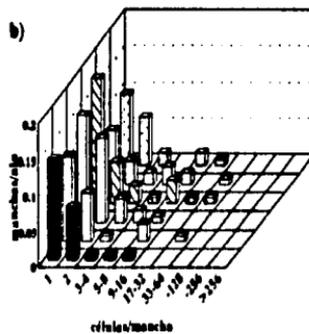
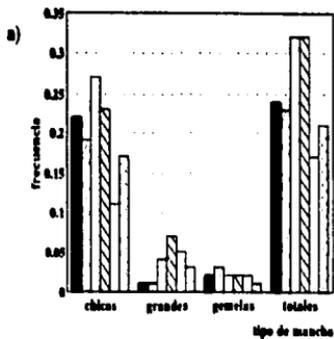
Conc. (ppm)	No. de alas	Manchas marcillas chicas n = 1 No. (fr)	Manchas marcillas grandes n = 5 No. (fr)	Manchas gumias n = 5 No. (fr)	Manchas totales n = 2 No. (fr)	Ciomas <u>cmh</u>	Ciclo de división celular promedio	Frec. de formación de ciomas x 10 ⁻¹ Obs. -ttest.	
Test.	120	26 (0.22)	1 (0.01)	2 (0.02)	29 (0.24)	29	1.52	1.0	
50	118	22 (0.19)	1 (0.01)	4 (0.03)	27 (0.23)		1.89	0.9	-0.1
75	120	32 (0.27)	5 (0.04)	2 (0.02)	39 (0.32)	39	1.77	1.3	0.1
100	120	28 (0.23)	8 (0.07)*	2 (0.02)	38 (0.32)	36	1.97	1.2	0.2
125	120	13 (0.11)	6 (0.05)	2 (0.02)	21 (0.17)	21	2.43	0.7	-0.1
150	120	20 (0.17)	4 (0.03)	1 (0.01)	25 (0.21)	24	1.92	0.8	-0.2

Análisis estadístico de acuerdo a Frel y Mürzler (1988).

Test. = Etanol + Tween 80 (3:1) 4.5%.

* = positivo, - = negativo, i = indeterminado.

Niveles de probabilidad: $\alpha = \beta = 0.05$.



a-asarona (ppm)



a) Frecuencia de manchas

b) Células/mancha

c) Manchas/mosca

Figura 8. Resultados obtenidos con a-asarona. Tratamiento: 72 x 48 h.

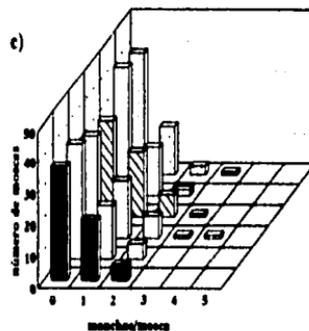


Tabla V. Frecuencia de manchas inducidas por DNM (925 ppm) ante alquienil bencenos (α -asarona y compuesto 6) en las alas de Drosophila. Exposición: 72 x 6 x 48 hs.

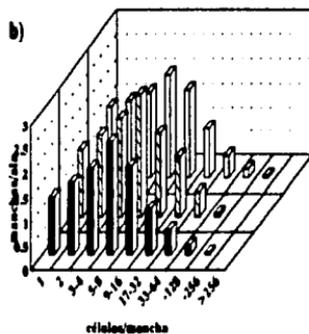
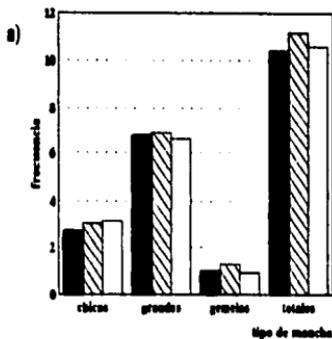
Conc. [ppm]	No. de alas	Manchas seccillas chicas n = 2 (fr)	Manchas seccillas grandes n = 5 (fr)	Manchas gemelas n = 5 (fr)	Manchas totales n = 2 (fr)	Ciclos <u>ml</u>	Ciclos de división celular promedio	Frec. de formación de ciclos x 10 ⁻³ Obs. -test.	
Test.	112	(2.71)	(6.76)	(0.94)	(10.40)	940	3.57	34.4	
<u>α-asarona.</u>									
50	100	(3.03)	(6.88)	(1.24)	(11.15)	849	3.44	34.8	0.4
100	126	(3.13)	(6.59)	(0.89)	(10.40)	1066	3.45	34.7	0.3
<u>Compuesto 6.</u>									
50	114	(2.89)	(7.14)	(1.09)	(11.12)	981	3.56	35.3	0.9
100	110	(2.75)	(6.80)	(1.19)	(10.75)	885	3.64	33.0	-1.4

Análisis estadístico de acuerdo a Frei y Würgler (1980).

Test. = Sacarosa 5%.

* = positivo, - = negativo, i = indeterminado.

Niveles de probabilidad: $\alpha = \beta = 0.05$.



DMN 925 ppm + a-asarona [ppm]

■ 0 ▨ 50 □ 100

a) Frecuencia de manchas

b) Células/mancha

c) Manchas/mosca

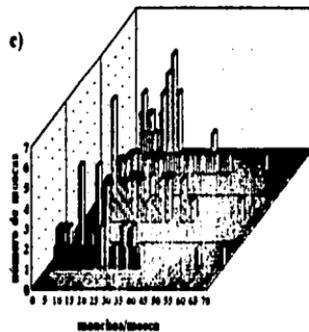


Figura 9. Resultados obtenidos con a-asarona ante N-Nitroso-dimetilamina. Tratamiento: 72 x 6 x 48 h.

Tabla VI. Frecuencia de manchas inducidas por el compuesto 2 en las alas de Drosophila melanogaster. Exposición: 72 x 48 hs.

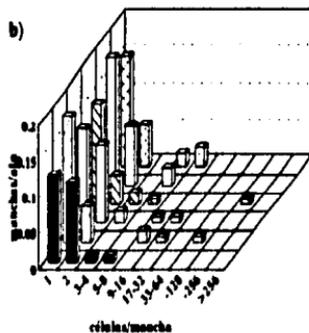
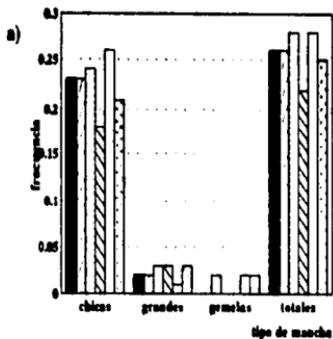
Conc. [ppm]	No. de alas	Manchas sencillas chicas n = 2 No. (fr)	Manchas sencillas grandes n = 5 No. (fr)	Manchas gemelas n = 5 No. (fr)	Manchas totales n = 2 No. (fr)	Clones mh	Ciclos de división celular promedio	Frec. de formación de clones x 10 ⁻⁵ Obs. -test.	
Test.	98	23 (0.23)	2 (0.02)	0 (0.00)	25 (0.26)	25	1.64	1.0	
50	118	27 (0.23)	2 (0.02)	2 (0.02)	31 (0.26)	31	1.74	1.1	0.0
75	120	29 (0.24)	4 (0.03)	0 (0.00)	33 (0.28)	33	1.79	1.1	0.1
100	120	22 (0.18)	4 (0.03)	0 (0.00)	26 (0.22)	26	1.77	0.9	-0.2
125	120	31 (0.26)	1 (0.01)	2 (0.02)	34 (0.28)	33	1.48	1.1	0.1
150	120	25 (0.21)	3 (0.03)	2 (0.02)	30 (0.25)	29	1.76	1.0	-0.1

Análisis estadístico de acuerdo a Frei y Würzler (1980).

Test. = Etanol + Tween 80 (3:1) 4.5%.

* = positivo, - = negativo, i = indeterminado.

Niveles de probabilidad: $\alpha = \beta = 0.05$.



compuesto 2 [ppm]



a) Frecuencia de manchas

b) Células/mancha

c) Manchas/mosca

Figura 10. Resultados obtenidos con el compuesto 2. Tratamiento: 72 x 48 h.

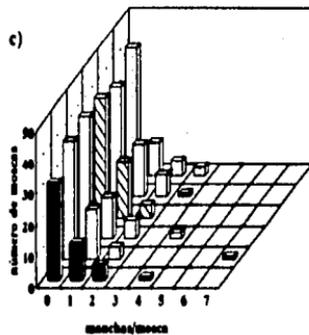


Tabla VII. Frecuencia de manchas inducidas por DNM (925 ppm) ante alquienil bencenos (compuestos 2, 7 y 11) en las alas de Drosophila. Exposición: 72 x 6 x 48 hs.

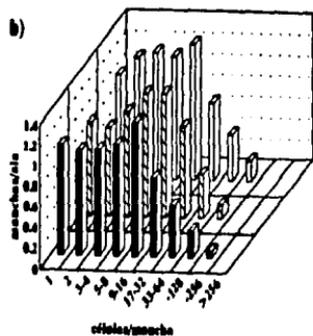
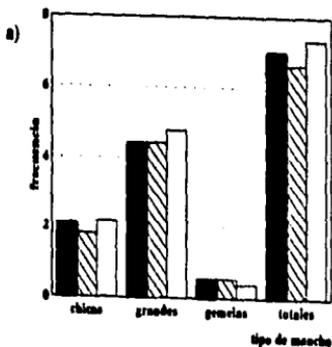
Conc. [ppm]	No. de alas	Manchas sencillas chicas n = 2 (fr)	Manchas sencillas grandes n = 5 (fr)	Manchas gemelas n = 5 (fr)	Manchas totales n = 2 (fr)	Clones <u>mlh</u>	Ciclos de división celular promedio	Frec. de formación de clones x 10 ⁻³ Obs. -test.	
Test.	144	(2.08)	(4.41)	(0.52)	(7.01)	831	3.61	23.7	
Compuesto 2.									
50	104	(1.78)	(4.33)	(0.54)	(6.64)	531	3.58	20.9	-2.7
100	92	(2.15)	(4.78)	(0.39)	(7.33)	545	3.58	24.3	0.6
Compuesto 7.									
50	88	(1.84)	(5.49)	(0.68)	(8.01)	519	3.77	24.2	0.5
100	94	(2.17)	(5.50)	(0.76)	(8.43)	607	3.65	26.5	2.8
Compuesto 11.									
50	82	1.96	5.37	0.62	7.95	485	3.66	24.3	0.6
100	108	2.04	4.44	0.77	7.24	585	3.47	22.2	-1.5

Análisis estadístico de acuerdo a Frel y Würzler (1988).

Test. = Sacarosa 5%.

* = positivo, - = negativo, i = indeterminado.

Niveles de probabilidad: $\alpha = \beta = 0.05$.



DMN 925 ppm + compuesto 2 (ppm)

■ 0 ▨ 50 □ 100

a) Frecuencia de manchas

b) Células/mancha

c) Manchas/mosca

Figura 11. Resultados obtenidos con el compuesto 2 ante N-Nitroso-dimetilamina. Tratamiento: 72 x 6 x 48 h.

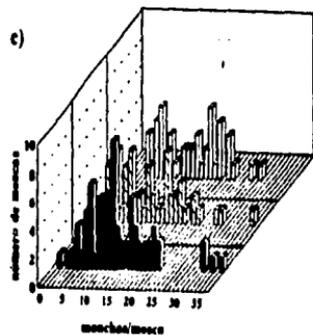


Tabla VIII. Frecuencia de manchas inducidas por el compuesto 6 en las alas de Drosophila melanogaster. Exposición: 72 x 48 hs.

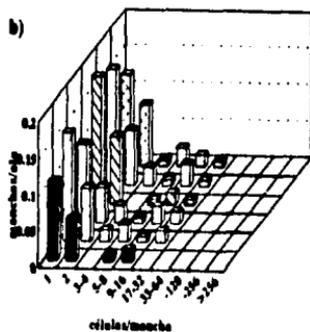
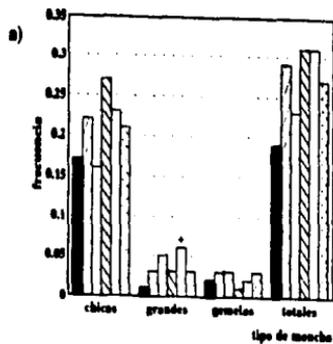
Conc. [ppm]	No. de alas	Manchas sencillas chicas	Manchas sencillas grandes	Manchas gemelas	Manchas totales	Clones <u>mlh</u>	Ciclos de división celular promedio	Frec. de formación de clones x 10 ³	
		n = 2 No. (fr)	n = 5 No. (fr)	n = 5 No. (fr)	n = 2 No. (fr)			Obs.	-test.
Test.	118	20 (0.17)	1 (0.01)	2 (0.02)	23 (0.19)	23	1.70	0.8	
50	120	27 (0.22)	4 (0.03)	4 (0.03)	35 (0.29)	35	1.91	1.2	0.4
75	120	19 (0.16)	6 (0.05)	3 (0.03)	28 (0.23)	28	2.25	1.0	0.2
100	120	32 (0.27)	4 (0.03)	1 (0.01)	37 (0.31)	36	1.89	1.2	0.4
125	120	28 (0.23)	7 (0.06)*	2 (0.02)	37 (0.31)	34	1.88	1.2	0.4
150	120	25 (0.21)	4 (0.03)	3 (0.03)	32 (0.27)	31	1.94	1.1	0.3

Análisis estadístico de acuerdo a Frel y Würigler (1988).

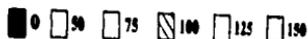
Test. = Etanol + Tween 80 (3:1) 4.5%.

* = positivo, - = negativo, i = indeterminado.

Niveles de probabilidad: $\alpha = \beta = 0.05$.



compuesto 6 (ppm)

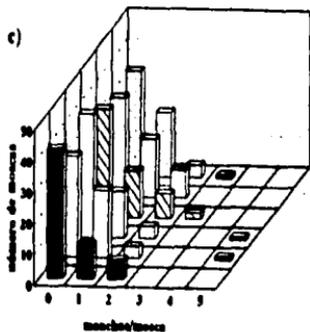


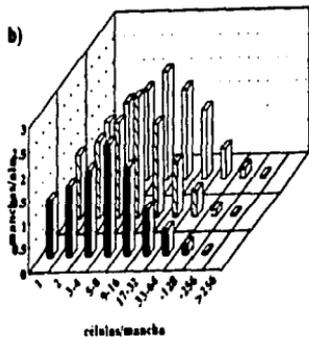
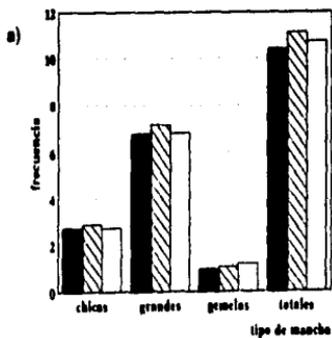
a) Frecuencia de manchas

b) Células/mancha

c) Manchas/mosca

Figura 12. Resultados obtenidos con el compuesto 6. Tratamiento: 72 x 48 h.





DMN 925 ppm + compuesto 6 (ppm)

■ 0 ▨ 50 □ 100

- a) Frecuencia de manchas
 b) Células/mancha
 c) Manchas/mosca

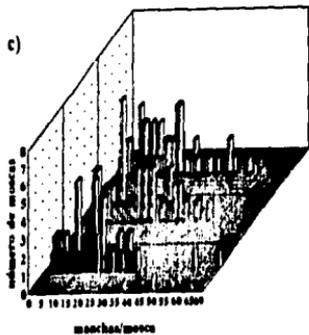


Figura 13. Resultados obtenidos con el compuesto 6 ante N-Nitroso-dimetilamina. Tratamiento: 72 x 6 x 48 h.

Tabla IX. Frecuencia de manchas inducidas por el compuesto 7 en las alas de Drosophila melanogaster. Exposición: 72 x 48 hs.

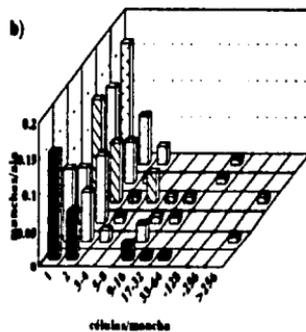
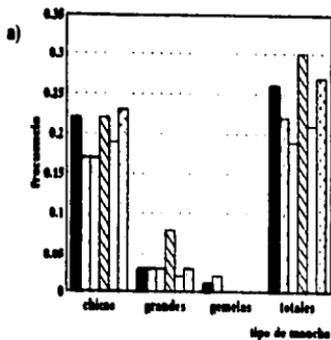
Conc. [ppm]	No. de alas	Manchas sencillas chicas n = 2 No. (fr)	Manchas sencillas grandes n = 5 No. (fr)	Manchas gemelas n = 5 No. (fr)	Manchas totales n = 2 No. (fr)	Clones n/h	Ciclos de división celular promedio	Frec. de formación de clones $\times 10^3$	
								Obs.	-test.
Test.	120	26 (0.22)	4 (0.03)	1 (0.01)	31 (0.26)	31	1.97	1.1	
50	120	20 (0.17)	4 (0.03)	2 (0.02)	26 (0.22)	26	2.19	0.9	-0.2
75	120	20 (0.17)	3 (0.03)	0 (0.00)	23 (0.19)	23	1.96	0.8	-0.3
100	120	27 (0.22)	9 (0.08)	0 (0.00)	36 (0.30)	36	2.25	1.2	0.2
125	120	23 (0.19)	2 (0.02)	0 (0.00)	25 (0.21)	25	1.60	0.9	-0.2
150	120	28 (0.23)	4 (0.03)	0 (0.00)	32 (0.27)	32	1.62	1.1	0.0

Análisis estadístico de acuerdo a Frel y Würzler (1988).

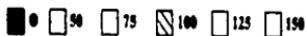
Test. = Etanol + Tween 80 (3:1) 4.5%.

* = positivo, - = negativo, I = indeterminado.

Niveles de probabilidad: $\alpha = \beta = 0.05$.



compuesto 7 (ppm)



- a) Frecuencia de manchas
- b) Células/mancha
- c) Manchas/mosca

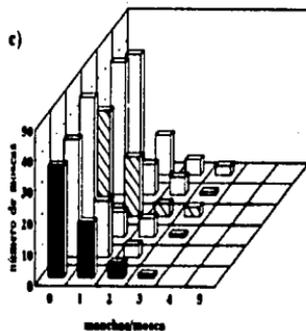
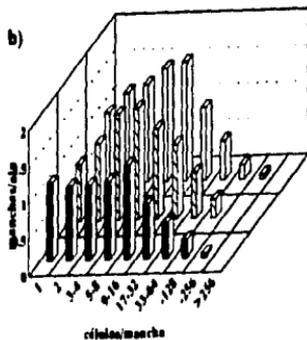


Figura 14. Resultados obtenidos con el compuesto 7. Tratamiento: 72 x 48 h.



DMN 925 ppm + compuesto 7 [ppm]

■ 50 ▨ 100

- a) Frecuencia de manchas
 b) Células/mancha
 c) Manchas/mosca

Figura 15. Resultados obtenidos con el compuesto 7 ante N-Nitroso-dimetilamina. Tratamiento: 72 x 6 x 48 h.



Tabla X. Frecuencia de manchas inducidas por el compuesto II en las alas de Drosophila melanogaster. Exposición: 72 x 48 hs.

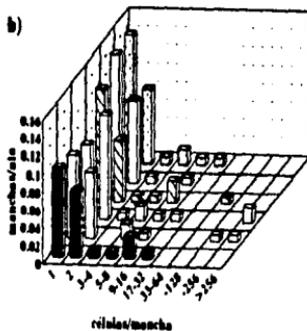
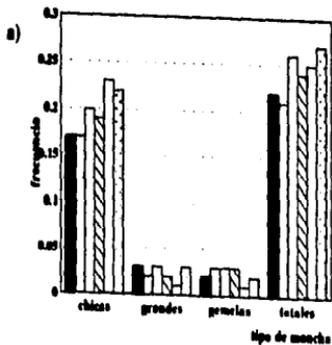
Conc. [ppm]	No. de alas	Manchas pequeñas chicas n = 2	Manchas pequeñas grandes n = 5	Manchas grandes n = 5	Manchas totales n = 2	Clones <u>med</u>	Ciclos de división celular promedio	Frec. de formación de clones x 10 ⁻¹	
		No. (fr)	No. (fr)	No. (fr)	No. (fr)			Obs.	-test.
Test.	120	21 (0.17)	4 (0.03)	2 (0.02)	27 (0.22)	26	2.00	0.9	
50	120	20 (0.17)	2 (0.02)	3 (0.03)	25 (0.21)	25	2.20	0.9	0.0
75	120	24 (0.20)	4 (0.03)	3 (0.03)	31 (0.26)	31	2.42	1.1	0.2
100	120	23 (0.19)	2 (0.02)	4 (0.03)	29 (0.24)	26	1.96	0.9	0.0
125	120	28 (0.23)	1 (0.01)	1 (0.01)	30 (0.25)	30	1.53	1.0	0.1
150	120	27 (0.22)	3 (0.03)	2 (0.02)	32 (0.27)	32	1.78	1.1	0.2

Análisis estadístico de acuerdo a Frei y Würzler (1988).

Test. = Etanol + Tween 80 (3:1) 4.5%.

* = positivo, - = negativo, I = indeterminado.

Niveles de probabilidad: $\alpha = \beta = 0.05$.



compuesto 11 [ppm]



a) Frecuencia de manchas

b) Células/mancha

c) Manchas/mosca

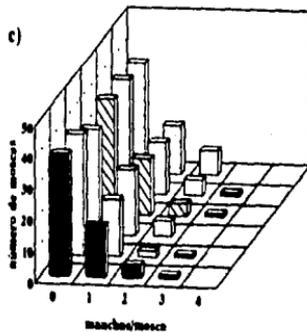
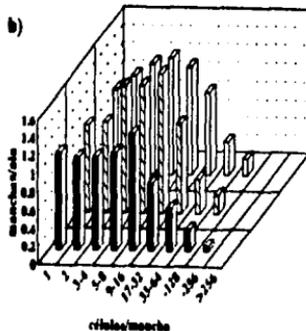
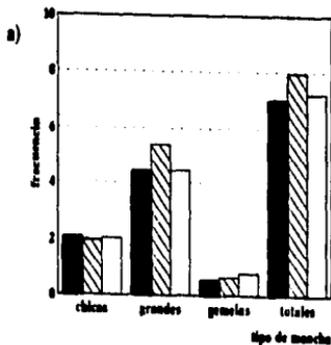


Figura 16. Resultados obtenidos con el compuesto 11. Tratamiento: 72 x 48 h.



DMN 925 ppm + compuesto 11 (ppm)

0
 50
 100

a) Frecuencia de manchas

b) Células/mancha

c) Manchas/mosca

Figura 17. Resultados obtenidos con el compuesto 11 ante N-Nitroso-dimetilamina. Tratamiento: 72 x 6 x 48 h.

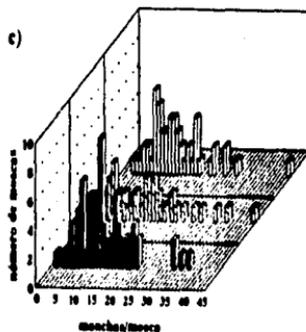


Tabla XI. Frecuencia de manchas inducidas por β -asarona en las alas de Drosophila melanogaster. Exposición: 72 x 48 hs.

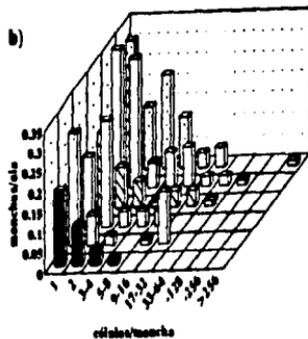
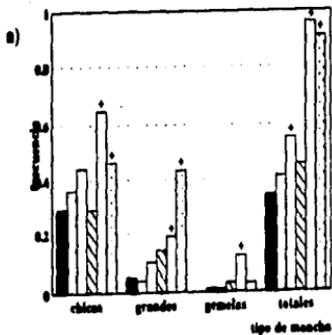
Conc. [ppm]	No. de alas	Manchas pequeñas n = 2 No. (fr)	Manchas medianas n = 5 No. (fr)	Manchas grandes n = 5 No. (fr)	Manchas totales n = 2 No. (fr)	Ciome mm	Ciclos de división celular promedio	Frec. de formación de ciome $\times 10^{-3}$ Obs. -test.	
Test.	80	23 (0.29)	4 (0.05)	0 (0.00)	27 (0.34)	26	1.58	1.3	
18.5	78	28 (0.36)	3 (0.04)	1 (0.01)	32 (0.41)	31	1.52	1.6	0.3
46.25	80	35 (0.44)	8 (0.10)	1 (0.01)	44 (0.55)*	42	2.02	2.2	0.8
92.5	80	23 (0.29)	11 (0.14)1	2 (0.03)	36 (0.45)	35	2.40	1.8	0.5
185	80	52 (0.65)*	15 (0.19)*	10 (0.12)*	77 (0.96)*	76	2.37	3.9	2.6
370	80	37 (0.46)*	34 (0.43)*	2 (0.03)	73 (0.91)*	70	2.57	3.6	2.3

Análisis estadístico de acuerdo a Frei y Würzler (1988).

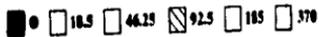
Test. = Etanol + Tween 80 [3:1] 4.5%.

* = positivo, - = negativo, 1 = indeterminado.

Niveles de probabilidad: $\alpha = \beta = 0.05$.



b-sarona (ppm)



a) Frecuencia de manchas

b) Células/mancha

c) Manchas/mosca

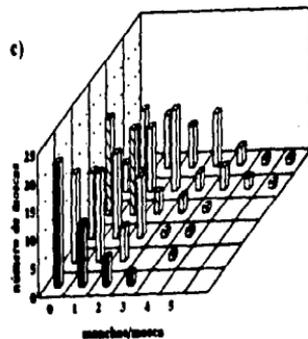


Figura 18. Resultados obtenidos con b-sarona. Tratamiento: 72 x 48 h.

Tabla XII. Frecuencia de manchas inducidas por la infusión de Guatteria sp. en las alas de Drosophila melanogaster. Exposición: 72 x 48 hs.

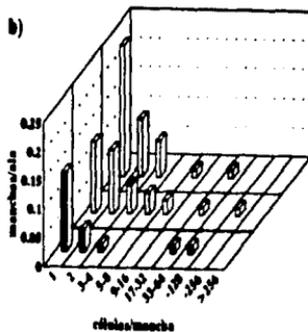
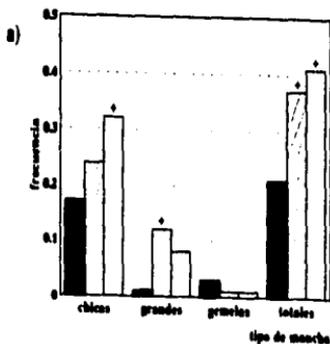
Cooc. (h)	No. de alas	Manchas sencillas chicas	Manchas sencillas grandes	Manchas gemelas	Manchas totales	Clones <u>mb</u>	Ciclos de división celular promedio	Frec. de formación de clones x 10 ⁻³	
		n = 2 No. (fr)	n = 5 No. (fr)	n = 5 No. (fr)	n = 2 No. (fr)			Obs.	-test.
Test.	80	14 (0.17)	1 (0.01)	2 (0.03)	17 (0.21)	17	1.94	0.9	
50	80	19 (0.24)	10 (0.12)	1 (0.01)	30 (0.37)*	28	2.54	1.4	0.6
100	80	26 (0.32)*	6 (0.08)	1 (0.01)	33 (0.41)*	32	1.84	1.6	0.8

Análisis estadístico de acuerdo a Frei y Würgler (1988).

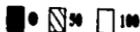
Test. = Agua destilada.

* = positivo, - = negativo, i = indeterminado.

Niveles de probabilidad: $\alpha = \beta = 0.05$.



Gnatteria sp. [%]



a) Frecuencia de manchas

b) Células/mancha

c) Manchas/mosca

Figura 19. Resultados obtenidos con *Gnatteria* sp.
 Tratamiento: 72 x 48 h.

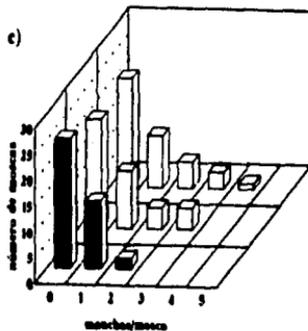


Tabla XIII. Frecuencia de manchas inducidas por DDM (925 ppm), ante la infusión de Guatteria sp. en las alas de Drosophila melanogaster. Exposición: 72 x 6 x 48 hs.

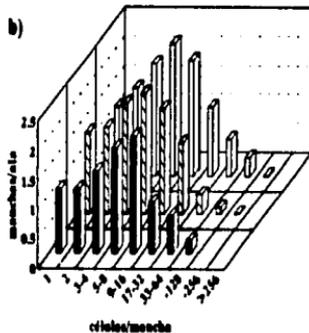
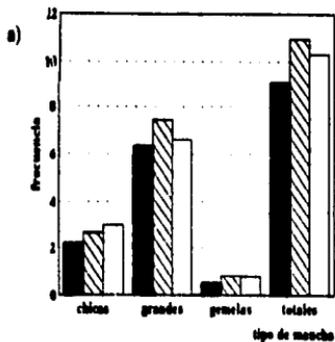
Conc. [%]	No. de alas	Manchas oecillias chicas n = 2 (fr)	Manchas oecillias grandes n = 5 (fr)	Manchas gumilae n = 5 (fr)	Manchas totales n = 2 (fr)	Ciomas <u>mm</u>	Ciclos de división celular promedio	Frec. de formación de ciomas x 10 ⁻³ Obs. -test.	
Test.	62	(2.19)	(6.34)	(0.55)	(9.08)	393	3.64	26.0	
50	80	(2.86)	(6.60)	(0.84)	(10.30)	647	3.33	33.2	7.2
100	76	(2.63)	(7.43)	(0.86)	(10.92)	642	3.63	34.7	8.7

Análisis estadístico de acuerdo a Frei y Würzler (1988).

Test. = Sacarosa 5%.

* = positivo, - = negativo, i = indeterminado.

Niveles de probabilidad: $\alpha = \beta = 0.05$.



DMN 925 ppm + *Gutteria* sp. [%]

■ 0 □ 50 ▨ 100

- a) Frecuencia de manchas
 b) Células/mancha
 c) Manchas/mosca

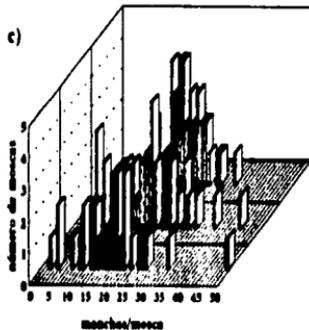


Figura 20. Resultados obtenidos con *Gutteria* sp. ante N-Nitroso-dimetilamina. Tratamiento: 72 x 6

15
 20 x 48 h.

DISCUSIÓN

En toxicología genética es prioritario establecer si los compuestos químicos de interés pueden clasificarse como mutágenos o carcinógenos o bien si al ser biotransformados en el organismo adquieren la actividad (promutágenos y procarcinógenos). El avance en este aspecto facilita establecer además, las condiciones en las que el uso de los compuestos implica el menor peligro posible, de manera que el efecto detectable de su actividad genotóxica resulte nulo o al menos significativamente inferior a un nivel de efecto mínimo predefinido.

En estudios farmacológicos y de genotoxicidad, los isómeros de asarona (α y β) producen efectos similares, sin embargo, el isómero *cis* (β -asarona) ha mostrado una mayor actividad en la inducción de daño en el DNA. Por otra parte no se ha reportado que este isómero tenga también efecto hipocolesterolemiante como lo ha demostrado la α -asarona en algunos organismos. Se ha observado que con frecuencia los isómeros *cis* son más activos que los *trans*, por ejemplo, el *cis*-platino (Gianni 1987).

Los resultados obtenidos en este trabajo concuerdan con lo reportado para la β -asarona, que ha mostrado tener actividad mutagénica y carcinogénica en algunos bioensayos, y también produjo efectos positivos evidentes en la inducción de manchas mosaico sobre las alas de Drosophila melanogaster, a diferencia de la α -asarona y los otros análogos; de éstos sólo dos compuestos (α -asarona y el compuesto 6) resultaron positivos para una concentración y un tipo de manchas.

La α -asarona y sus análogos pueden no interferir directamente con el DNA para provocar daño observable como manchas mosaico en Drosophila, sin embargo, podrían participar en otros procesos celulares debido a los efectos farmacológicos demostrados en otros organismos, como la inhibición de la síntesis de proteínas. Por otra parte, estos compuestos pueden participar en vías metabólicas de activación o desintoxicación cuyo resultado no se manifieste como daño genotóxico en el nivel esperado.

En tejidos de roedores se ha mostrado que las sulfotransferasas citosólicas están involucradas en la bioactivación de procarcinógenos y drogas en electrófilos reactivos. Algunas de estas enzimas (las fenol sulfotransferasas) están implicadas en la sulfatación y/o bioactivación de alquienilbencenos y N-hidroxiarilaminas. Los estudios de purificación de sulfotransferasas de hígado de rata han indicado que las fenol sulfotransferasas son capaces de sulfatar procarcinógenos in vitro. La purificación de fenol sulfotransferasas de rata ha identificado diferentes formas, pero sólo algunas parecen estar involucradas en la bioactivación de procarcinógenos (Falany y Wilborn, 1994). Sin embargo, los alquienilbencenos *cis* y *trans*-asarona mostraron su actividad hepatocarcinogénica en roedores, y estas actividades no fueron inhibidas por la administración previa de pentaclorofenol, un inhibidor de sulfotransferasas (Wiseman et al, 1987). Efectos similares fueron reportados por Hasheminejad y Caldwell en 1994. Los resultados obtenidos en Drogophila podrían ser explicados de diferente manera: los compuestos no siguen una bioactivación similar por sulfotransferasas; o bien, que exista una activación preferencial por alquienilbencenos con estructura *cis*- (β -asarona), de tal manera que los análogos *trans*- (α -asarona y análogos) no sean activados y sigan alguna otra ruta de desintoxicación; que la incorporación (directa o por activación) y eliminación favorecen a esta última de manera que no alcanza a acumularse suficiente compuesto reactivo para producir efectos detectables.

Wiseman et al (1987), en estudios de carcinogénesis en roedores propusieron que aunque faltan evidencias directas, la epoxidación del doble enlace propenilico es la ruta más viable de activación de las asaronas in vivo, y que en otros alquienilbencenos la activación es por hidroxilación de la cadena lateral y/o sulfatación resultando en derivados 1'hidroxi o sulfato. Los autores propusieron que este tipo de compuestos siguen una bioactivación con la participación del citocromo P-450.

Hasheminejad y Caldwell (1994) estudiaron el mecanismo de genotoxicidad de las asaronas en hepatocitos para elucidar el papel del citocromo P-450 y obtener más información acerca de la relación entre la estructura, metabolismo y genotoxicidad de los alquenilbencenos. Ellos observaron que la genotoxicidad de las asaronas es anulada por el inhibidor de citocromo P-450, cimetidina. El principal metabolito de las asaronas en hepatocitos fue identificado como ácido 2,4,5-trimetocinámico, pero este no fue genotóxico cuando se probó separadamente. Puede ser que el paquete enzimático de citocromo P-450 en Drosophila, promueva la rápida desintoxicación de la α -asarona y sus análogos trans, lo que reduciría la posibilidad de acumulación de metabolitos genotóxicos.

Los efectos de otros alquenilbencenos han sugerido la participación de diferentes vías de activación o desintoxicación. Un alquenil benceno derivado de la esencia de clavo, (eugenol y algunos análogos) producen daño hepático en ratones carentes de glutatión (GSH) por pretratamientos con buthionina sulfoximina (BSO). La comparación de los compuestos probados mostró que los requerimientos estructurales para la potencia tóxica fue un anillo fenólico teniendo un sustituyente allyl en la posición-4 (Mizutani et al., 1991). No se puede descartar la participación de glutatión en la desintoxicación de los alquenil bencenos probados en este trabajo, por lo mismo, se requirieron mayores esfuerzos en la elucidación de las interacciones de este tipo de compuestos en el metabolismo.

En otros estudios, se ha propuesto que durante el metabolismo de los alquenil bencenos (incluidos ambos isómeros de asarona) se producen iones carbonilo que son más estables que los iones producidos por compuestos inactivos; y que la estabilidad relativa del ion carbonilo parece ser uno de los factores clave en la genotoxicidad de allylbencenos y propenilbencenos en la síntesis no programada de DNA (Tsai et al., 1994).

De acuerdo a lo reportado, resulta evidente que los efectos genotóxicos de los alquenil bencenos α - y β -asarona son producidos por sus metabolitos, más que por los compuestos no modificados, por

lo anterior resulta necesario determinar la ruta de bioactivación de estos isómeros.

El mecanismo de acción de los mutágenos puede ser elucidado por tratamientos con agentes combinados que exhiben varios tipos de interacción con los agentes mutagénicos. La elección de modificadores con efectos específicos en procesos mutagénicos y recombinogénicos puede dar información útil para la interpretación del mecanismo de acción de químicos mutagénicos en tales experimentos de interacción (Ramel y Magnusson, 1992).

Los experimentos realizados para evaluar la interacción de los compuestos ante el alquilante indirecto N-Nitroso-dimetilamina, no mostraron algún efecto claro. Al parecer, estos compuestos siguen diferentes vías metabólicas que no interfieren directamente, por lo cual, el efecto de la DMN aparentemente no es alterado. Esto resulta evidente para los compuestos con conformación trans-, no obstante, sería conveniente probar el isómero cis- en el mismo tipo de tratamiento para esclarecer si éste isómero que resultó positivo individualmente en la inducción de daño somático, puede modificar la genotoxicidad de la DMN.

Los efectos positivos obtenidos en los tratamientos con la infusión de Guatteria sp, sugieren la presencia de otros metabolitos en la corteza de la planta, y aunque no se ha reportado la presencia de β -asarona en Guatteria gaumeri, es común que se presenten juntos ambos isómeros en la naturaleza. Por otra parte, siendo las infusiones mezclas complejas de metabolitos, puede ocurrir que el efecto de las infusiones de Guatteria sp. en Drosophila, se deba a la interacción de los compuestos presentes en la corteza.

Los ensayos de genotoxicidad somática de Drosophila están en principio basados en la obtención de sectores del cuerpo de la mosca que expresan un fenotipo diferente (clones mutantes) y que son recuperados en número variable en moscas individuales.

El análisis de la distribución de manchas por mosca, revela que algunos organismos son particularmente sensibles al efecto de los xenobióticos, lo que se ha interpretado a través de diferencias

en el sexo del organismo, su susceptibilidad, el polimorfismo genético, y la ingesta diferencial del compuesto, entre otras causas. El empleo de métodos estadísticos no paramétricos hace posible la comparación cuantitativa de la distribución de manchas por mosca de las poblaciones expuestas y las testigo, bajo la suposición de que la distribución poblacional del número de manchas por mosca se modifica ante factores de presión (Frei y Würgler, 1995; Ramos et al., 1996).

La aplicación de la prueba no paramétrica U de Mann-Whitney-Wilcoxon en el análisis de los resultados obtenidos con la SMART, ha permitido tomar mejores decisiones ante la falta de respuestas claramente positivas o negativas en la inducción de manchas. El diagnóstico obtenido mediante el análisis propuesto por Frei y Würgler (1988) y la prueba U coincidió en la mayor parte de los casos, resultando aparentemente más sensible la segunda prueba (Tabla XIV).

El análisis desarrollado por Frei y Würgler (1988) mide el efecto global de la inducción de manchas en la población tratada, es decir, cuántas manchas por ala se recobraron en las moscas tratadas en comparación con las moscas testigo, sin embargo, es poco específica ya que aunque agrupa a las manchas por el fenotipo de células, sólo establece una diferencia por tamaño: manchas chicas que son formadas por 1 ó 2 células y manchas grandes las formadas por 3 o más células lo que implica proliferación de la clona celular posterior al tiempo de inducción de la alteración en la información genética de la célula afectada original. La prueba U se aplicó para comparar dos aspectos: a) la dispersión en la distribución del número de células que forman cada mancha y b) la dispersión en el número de manchas por mosca. Mediante estas comparaciones es posible determinar modificaciones sutiles debidas a la presencia de posibles genotóxicos, aún antes de que se manifiesten en incrementos en la frecuencia de manchas por ala. Además, el análisis del número de manchas por mosca muestra claramente que los efectos de los genotóxicos se manifiestan inicialmente en el sector más sensible de una población y que la

Tabla XIV. Resumen del diagnóstico estadístico de acuerdo a Frei y Würqler y la prueba no paramétrica U de Mann-Whitney-Wilcoxon en SMART.

Compuesto	Frei y Würqler (1988)				U de Mann-Whitney			
	Tipo de mancha				Céls/ mancha		Manchas/ noeas	
	Ch	Gr	Ce	T	T	S	T	S
a-asarona 50 75 100 125 150		+						75a 100a 125a
C-2 50 75 100 125 150								
C-6 50 75 100 125 150		+			+			
C-7 50 75 100 125 150							D+	D50+
C-11 50 75 100 125 150					+	75a		
					+	125a		
b-asarona 18.5 46.25 92.5 185 370	+	-	+	+	+		+	
	+	-		+	+		+	
Guatteria 50a 100a	+	+		+	+	D100a		D100a
				+	D+			

+ = positivo
D = positivo ante DMN (925ppm).

fracción de organismos afectados se incrementa gradualmente conforme se intensifica el efecto del genotóxico administrado.

En este trabajo, la prueba mostró resultados significativos del inómero β -asarona que se manifestaron en una frecuencia de manchas por ala mayor en las series tratadas, recobrándose manchas formadas por mayor cantidad de células que se recobraron en mayor número en una fracción de las moscas tratadas cuando larvas. La prueba U, sin embargo, aunque mostró sobredispersión en el número de manchas por mosca entre lotes en las concentraciones con 75 y 100 ppm con respecto a 125 ppm. Para el compuesto 6 se obtuvo respuesta significativa según Frei y Würgler en la frecuencia de manchas grandes a 125 ppm pero la misma no fue significativa en la prueba U, sin embargo se detectó sobredispersión en el número de células por mancha a una concentración menor (50 ppm) del mismo compuesto. Con respecto a ese mismo tipo de distribución, la prueba U indicó diferencias significativas en los tratamientos de 50 a 100 ppm del compuesto 11 con respecto al lote testigo, y diferencias entre los lotes tratados con 75 y 125 ppm del compuesto. En el caso de las infusiones de Guatteria ambas pruebas concordaron en el diagnóstico para 50 ppm. También en los compuestos 2 y 7 ambas pruebas concordaron en el diagnóstico negativo. En los tratamientos con la DMN, la prueba U dio positivo para el compuesto 7 (100 ppm) con respecto al control y entre lotes (50 y 100 ppm). En los tratamientos con la DMN e infusiones de Guatteria se modificaron las distribuciones del número de células por mancha y del número de manchas por mosca en las moscas tratadas con 100 ppm de la infusión previo al tratamiento con la DMN.

Por otra parte, y en relación a la actividad hipolipidémica de α -asarona y sus análogos, se ha reportado que la ausencia de esteroles disponibles para el metabolismo causa la muerte de las larvas de Drosophila y que la adición de dosis subóptimas de colesterol al medio permite la sobrevivencia de las larvas. En larvas con dietas deficientes en esteroles lleva en los estados preimagales a la supresión tanto de entrecruzamientos espontáneos e inducidos por alta temperatura en las hembras de Drosophila. Los

autores de estos experimentos sugirieron dos posibles explicaciones para la dependencia de la recombinación en el metabolismo de esteroides: 1) la escasez de precursores de biosíntesis de ecdisonas fue la causa de la discordancia de eventos meióticos, 2) la supresión de entrecruzamiento ocurrió, debido a la alteración de la estructura de las membranas celulares (Kamilova et al., 1990). Si esto es cierto, podría ocurrir que los compuestos análogos de asarona intervinieran en procesos de desarrollo, más que en eventos genotóxicos, y si este tipo de eventos interfieren con eventos de recombinación, la ausencia de manchas gemelas en algunas concentraciones de los compuestos usados podría en parte ser deberse a este tipo de interacción.

Es posible que este tipo de actividad a nivel de desarrollo esté relacionado al efecto de las asaronas observado en larvas de nematodos. En larvas de segundo estadio de Toxocara canis se registraron dos acciones independientes: la movilidad de las larvas fue rápidamente inhibida cuando se incubaron con asarona, pero este evento fue temporal y reversible. Sin embargo, cuando la movilidad disminuyó otra vez durante una incubación prolongada, la viabilidad de la larva desapareció, mostrando que murieron a causa del compuesto (Sugimoto et al., 1995). El efecto de los compuestos de asarona en el desarrollo de Drosophila podría ser semejante a los experimentos con deficiencias en colesterol si se expusieran los organismos durante todo su ciclo de vida a los compuestos.

La actividad farmacológica de los compuestos probados es de gran importancia para su posible uso en medicina, sin embargo se requiere conocer mejor su actividad genotóxica.

CONCLUSIONES

1. Los compuestos que mostraron actividad genotóxica fueron: α -asarona, el compuesto 6, β -asarona y la infusión de Guatteria sp.
2. La β -asarona fue el único compuesto que mostró actividad recombinogénica.
3. Los compuestos no modificaron la inducción de manchas por la N-Nitroso-dimetilamina según el análisis convencional de Frei y Würgler, aunque la infusión de la planta incrementó ligeramente la frecuencia de manchas inducidas por esta sustancia.
4. La prueba U de Mann-Withney-Wilcoxon logró discriminar diferencias significativas en la distribución del número de células por mancha para el compuesto 6, el compuesto 11, β -asarona y Guatteria sp. Esta última además modificó significativamente la distribución de células por mancha inducidas por DMN.
5. La sobredispersión de manchas por mosca fue modificada significativamente por los isómeros α y β -asarona. Ante DMN, sólo el compuesto 7 y las infusiones de la planta mostraron diferencias significativas.
6. El isómero cis (β -asarona) mostró una mayor actividad respecto a los compuestos con estructura trans.
7. El modelo de Drosophila permite discriminar el potencial genotóxico de diferentes especies químicas y la interacción entre éstas.

REFERENCIAS

- Abundis H. M. (1996) Determinación de la mutación y recombinación somáticas en la inducción de efectos genotóxicos por tres sales de vanadio en Drosophila melanogaster. Tesis de Maestría, Facultad de Ciencias UNAM. 90 pp.
- Alberts B., D. Bray, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts y J. D. Watson (1994) Molecular biology of the cell. Garland Publishing Inc. New York, U. S. A. 1294 pp.
- Ames B., W. Durston, E. Yamasaki y F. 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
- Bears A. J., G. H. Blijleven, G. R. Mohn, A. T. Natarajan y D. D. Brüner (1980) Preliminary studies on the ability of Drosophila melanogaster preparations to active mutagens and carcinogens. Mutation Res., 72: 257-264
- Budavari S. (Ed.) (1989) The Index Merck. An Encyclopedia of Chemicals, Drugs and Biologicals. 11 ed. Merck & Co. Inc. Rahaway, N. J. U.S.A. 1606 pp.
- Brusick D. (1988) Evolution of testing strategies for genetic toxicity. Mutation Res., 205: 69-78
- Cairns J. (1981) The origin of human cancers. Nature, 289: 353-357
- Chamorro G., M. Salazar, S. Salazar y T. Mendoza (1993). Farmacología y toxicología de Gutteria gaumeri y alfasona. Rev. Invest. Clin. 45: 597-604

- Clark A. M. (1982) The use of larval stages of Drosophila melanogaster in screening for some naturally occurring mutagens. *Mutation Res.*, 2: 89-97
- Clayson D. (1980) Comparison between in vitro and in vivo tests for carcinogenicity. *Mutation Res.*, 75: 205-213
- Cox P. A. (1994). The ethnobotanical approach to drug discovery: strengths and limitations. En: *Ethnobotany and the search for new drugs*. Wiley, Chichester (Ciba Foundation Symposium 185) p. 25-41
- Crick F. C. H. y P. A. Lawrence (1975) Compartments and polyclones in insect development. *Science*, 189: 340-347
- Dandiya P. C. y M. K. Menon (1963) Effects of asarone and β -asarone on conditioned responses, fighting behaviour and convulsions. *Brit. J. Pharmacol.* 20: 436-442
- Delgado R. A. (1990) Daño genético inducido por mutágenos positivos en células del ala de Drosophila melanogaster. Tesis de Licenciatura, Facultad de Ciencias, U.N.A.M. 75 pp.
- Demerec M. y B. P. Kaufmann (1962) Introducción a la genética y citología de Drosophila melanogaster. Comisión Nacional de Energía Nuclear, México 56 pp.
- De Serres F. J. (1979) Evaluation of test for mutagenicity as indicators of environmental mutagens and carcinogens. *Am. N. Y. Acad. Sci.* 74-84
- Díaz F. M., L. Contreras, R. Flores, J. Tamariz, F. Labarrios, G. Chamorro y H. Muñoz (1990). An efficient synthesis of alpha-asarone. *Org. Prep. Proc. Int.* 23: 133-138.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

- Díaz F. M., H. Muñoz, F. Lebarrios, G. Chamorro, M. Salazar y M. E. Morelos (1993). Synthesis and hypolipidemic activity of some alpha-asarone analogs. *Med. Chem. Res.* 3: 101-109.
- Enríquez R. G., M. A. Chavez y F. Jáuregui (1980) Propenylbenzenes from *Guatteria guameri*. *Phytochemistry*, 19: 2024-2025
- Evans C. W. (1991) *Farmacognosia*. Interamericana McGraw-Hill. México, 901 pp.
- Falany C. N. y T. W. Wilborn (1994). Biochemistry of cytosolic sulfotransferases involved in bioactivation. *Adv. Pharmacol.* 27: 301-329
- Farsworth M. R. (1994). Ethnopharmacology and drug development. En: *Ethnobotany and the search for new drugs*. Wiley, Chichester (Ciba Foundation Symposium 185) p. 130-152
- Frel H. y F. E. Würigler (1988) Statistical methods to decide whether mutagenicity test data from *Drosophila* assays indicate a positive, negative or inconclusive result. *Mutation Res.*, 203: 297-308
- Frel H. y F. E. Würigler (1995) Optimal experimental design and sample size for the statistical evaluation of data from somatic mutation and recombination tests (SMART) in *Drosophila*. *Mutat. Res.* 334: 247-258.
- García C., J. Maldonado, R. Márquez, A. González, E. González, J. Rangel, L. F. Rosas, C. Saldaña, L. Moreno, P. Reyes, S. García, J. A. Muñoz, A. Nieto, N. Miranda, M. López, R. Gutiérrez, M. G. Ordez y P. Ramos (1991) Determinación de la capacidad antimutagénica de extractos de *Tagetes filifolia* en células del ala de *Drosophila melanogaster*. Curso de Biología de Campo. Facultad de Ciencias UNAM.

- García-Bellido A. y J. R. Merriam (1971a) Parameters of the wing imaginal disc development of Drosophila melanogaster. *Develop. Biol.*, 24: 61-87
- García-Bellido A. y J. R. Merriam (1971b) Clonal parameters of tergite development in Drosophila melanogaster. *Develop. Biol.*, 26: 264-276
- Garduño, L. M. Salazar, M.E. Morelos, F. Labarrios, J. Tamariz y G. A. Chamorro. 1997. Hypolipidaemic activity of α -asarone in mice. *J. Ethnopharmacol.* 55: 161-163.
- Gaytán J. C. (1993) Modulación del efecto genotóxico de la mitomicina-C (MMC) por las vitaminas A y C en células somáticas del ala en Drosophila melanogaster. Tesis de Maestría, Facultad de Ciencias, U.N.A.M. 71 pp.
- Gianni S. (1987). Tumor animal used for evaluating the antineoplastic activity for platinum coordination complexes. *Inorg. Chim. Acta* 137: 39-44
- Göggelmann W. y O. Schimmer (1983). Mutagenicity testing of β -asarone and commercial calamus drugs with Salmonella typhimurium. *Mutation Res.* 121: 191-194
- Gómez C., G. Chamorro, M. A. Chávez, G. Martínez, M. Salazar y N. Pages (1987). Effet de l' α -asarone sur l'hypercholestérolémie et la cholélithias expérimentales. *Plant. Med. Phytother.* 21: 279-284
- Graf U., F. Würglér, A. Katz, H. Frei, H. Juon, C. Hall y P. Kale (1984) Somatic mutation and recombination test in Drosophila melanogaster. *Environ. Mutagen.*, 6: 153-188

- Graf U. (1995) Analysis of the relationship between age of larvae at mutagen treatment and frequency and size of spots in the wing somatic mutation and recombination test in Drosophila melanogaster. Experientia. 51: 168-173
- Hällström I., J. Magnusson y C. Ramel (1982) Relation between the somatic toxicity of dimethyl-nitrosamine and genetically determined variations in the level and induction of cytochrome P450 in Drosophila melanogaster. Mutation Res., 92: 161-168
- Hasheminejad, G. Caldwell J. (1994) Genotoxicity of de alkenylbenzenes alpha- an beta-asarone, myristicin and elemicin as determined by the UDS assay in cultured rat hepatocytes. Food Chem. Toxicol. 32: 223-231
- Hernández, A., M. L. López, G. Chamorro y T. Mendoza-Figueroa (1993). Inhibition of lipid synthesis and secretion in long-term cultures of adult rat hepatocytes by α -asarone. Planta Med. 59: 121-124
- Hostettmann K., A. Marston y J. L. Wolfender (1995). Strategy in the search for new biologically active plant constituents. En: Hostettmann K., A. Marston, M. Maillard y M. Hamburger. Phytochemistry of plants used in traditional medicine. Oxford science publications. p. 17-46
- INI, (1994). Atlas de las plantas de la medicina tradicional mexicana. Tomo II. Instituto Nacional Indigenista. Biblioteca de la Medicina Tradicional Mexicana. pp. 585-587
- Jiménez L., G. Chamorro, M. Salazar y N. Pages (1988). Evaluation tératologique de l' α -asarone chez le rat. Ann. Pharm. Franc. 46: 179-183

- Kamilova T. A., E. M. Luchnikova y S. G. Inge-Vechtomov (1990). [The effect of sterol metabolism in a model ecological system *Drosophila*-yeasts on the crossing-over in *Drosophila*] (Resúmen). *Genetika* 26: 249-256
- Kinghorn A. D. (1992). Plants as a sources of medicinally and pharmaceutically important compounds. En: Nigg H. N. y D. Siegler (Eds.). *Phytochemical resources for medicine and agriculture*. Plenum Press, New York. p. 33-74
- Leclercq J., H Dehaussy, H. Goblet, M. C. Wauter, J. N. Angenot (1985) Description, identification and uses of yumel (stem bark of *Guatteria gaumeri* Greenman). *J. Pharm. Belg.* 40: 251-256
- Lewis H. W. (1992). Plants used medically by indigenous peoples. En: *Phytochemical resources for medicine and agriculture*. Nigg H. N. y D. Siegler (Eds.). Plenum Press, New York. p. 33-74
- Lindsley D. L. y S. Grell (1968) Genetic variations in *Drosophila melanogaster*. Kansas University Press. 1740 pp.
- Lindsley D. L. y G. G. Zimm (1979) Computerized stock list 2. *D.I.S.* Vol. 54. 165 pp.
- López M. L., A. Hernández, G. Chamorro y T. Mendoza-Figueroa (1993) α -asarone toxicity in long-term cultures of adult rat hepatocytes. *Planta Med.* 59: 115-120
- Lozoya X. (1994). Two decades of Mexican ethnobotany and research in plant drugs. En: *Ethnobotany and the search for new drugs*. Wiley, Chichester (Ciba Foundation Symposium 185) p. 130-152

- Maldonado J. (1994). Comparación entre la estructura química y la actividad mutagénica de cinco compuestos orgánicos en células del ala de Drosophila melanogaster. Tesis de Licenciatura, Facultad de Ciencias, UNAM. 60 pp.
- Mandoki J., C. Krumm, Vega J. C. Wong C. Arriaga R. Roa (1980). Aislamiento de la asarona de la corteza de Gutteria gaumeri (elemuy) y el estudio de su acción hipocolesterolemizante. Memorias del IV Congreso Nacional de Farmacología. Asociación Mexicana de Farmacología.
- Martínez M. (1959). Las plantas medicinales de México. Ed. Botas 656pp.
- Martínez M., J. Maldonado, P. Ramos y A. Campos. (1996) - Determinación del potencial genotóxico de las semillas de Thevetia thevetioides (huesito de fraile) en células de las alas de Drosophila melanogaster. Memorias del 4º Congreso Conjunto de las Sociedades Mexicanas de Genética y Toxicología Genética. p. 24
- Mitscher L. A., H. Telikepalli, P. B-B Wang, S. Kuo D. M. Shankel y G Stewart. 1992. Antimutagenicity of secondary metabolites from higher plants. Mut. Res. 267:229-241.
- Mizutani T., K. Satoh y H. Nomura (1991). Hepatotoxicity of eugenol and related compounds in mice depleted of glutathione: structural requirements for toxic potency. (Resúmen) Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol. 73: 87-95
- Morales P., E. Madrigal, J. Mercader, M. Cassani, G. González, G. Chamorro y M. Salazar (1992). Sister-chromatid exchange induction produced by in vivo and in vitro exposure to alpha-asarone. Mutation Res. 279: 269-273

- Muñoz J. A. (1994) Caracterización del potencial genotóxico y protector de Ipomoea orizabensis en células somáticas de Drosophila melanogaster. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias UNAM. 65 pp.
- Ordaz T. M. G. (1991) Valoración de la prueba de detección de mutación y recombinación somática (SMART) en las células del ojo de Drosophila melanogaster. Tesis de Licenciatura, Facultad de Ciencias, U.N.A.M. 96 pp.
- Orozco P. G. (1993) Efecto protector de la vitamina E y de los β -carotenos en contra de la mutagenicidad de la mitomicina C (MMC) en la prueba somática de ala de Drosophila melanogaster. Tesis de Maestría. Facultad de Ciencias, UNAM. 109 pp.
- Radman M. y A. Kinsella (1980) Chromosomal events in carcinogenic initiation and promotion: Implications for carcinogenicity testing and cancer prevention strategies. En R. Montesano, H. Bartach, L. Tomatis (Eds.): Molecular and Cellular Aspects for Carcinogen Screening Tests. International Agency for Research on Cancer, Lyon, pp. 75-90
- Ramel C. y J. Magnusson. 1992. Modulation of genotoxicity in Drosophila. Mutation. Res. 267:221-227
- Ramos P., H. Abundis, J. C. Gaytán, M. G. Ordaz, P. G. Orozco, J. Maldonado, J. Hernández, E. González, P. Reyes, E. M. Galicia y J. A. Muñoz (1993) Manual de Laboratorio de Genética para Drosophila melanogaster. McGraw-Hill, México. 131 pp.
- Ramos P., G. Ordaz, J. Maldonado, A. Muñoz, E. González, H. M. Abundis, A. Campos, M. Martínez, Y. Páez, M. Islas, J. Gaytán, P. Orozco, B. Hernández, Y. Dorantes, H. Rivas, A. Muñoz, e I. Jiménez. (1996) Susceptibilidad diferencial de Drosophila melanogaster en la prueba de mutación y

recombinación somática (SMART). Análisis de la distribución muestral. Memorias del 4º Congreso Conjunto de las Sociedades Mexicanas de Genética y Toxicología Genética. p. 5

Rodríguez R. y P. Ramos (1992) Drosophila como sistema para detectar agentes genotóxicos. Los pequeños Manuales. Prensa de Ciencias, Facultad de Ciencias UNAM. 50 pp.

Ruiz, E., G. Chamorro, E. Rodríguez, M. Salazar y G. Juárez (1996) Evaluación de la posible actividad genotóxica de alfa asarona en células gaméticas y somáticas de vegetales. Memorias del 4º Congreso conjunto de las sociedades Mexicanas de Genética y Toxicología Genética. p. 59

Ruiz, E., E. Rodríguez, G. Chamorro, M. Salazar y G. Juárez (1997) Evaluación del posible efecto genotóxico inducido por α -asarona en células meristemáticas de Allium cepa. Memorias del 2º Congreso Nacional Estudiantil de Toxicología Genética. p. 29

Salazar, M., S. Salazar, V. Ulloa, T. Mendoza, N. Pages y G. Chamorro (1992). Action teratogene de l'alpha-asarone chez la souris. J. Toxicol. Clin. Exp. 12: 149-154

Sharma, J. D., P. C. Dandiya, R. M. Baxter y S. I. Kandel (1961) Pharmacodynamical effects of asarone and β -asarone. Nature. 192: 1299-1300

Sugimoto N., Y. Goto, N. Akao, F. Kiuchi, K. Kondo e Y. Tsuda (1995) Mobility inhibition and nematocidal activity of asarone and related phenylpropanoids on second-stage larvae of Toxocara canis. (Resúmen) Bol. Pharm. Bull. 18: 605-609

Timbrell J. A. (1989) Introduction to toxicology. Taylor and Francis, New York. 155 pp.

- Todd M. J. Clements, P. Zoeller y M. Phillips (1983) Absence of a mutagenic effect after feeding 4 anti-cancer drugs to Drosophila melanogaster. Mutation Res., 120: 121-125
- Tsai, T. H., C. M. Chen y C. F. Chen (1991). Disposition of asarone after intravenous administration to rabbits assessed using HPLC. (Resúmen) Proc. West Pharmacol. Soc. 34: 107-112
- Tsai R. S., P. A. Carrupt, B. Testa y J. Caldwell (1994). Structure-genotoxicity relationships of allylbenzenes and propenylbenzenes: a quantum chemical study. Chem. Res. Toxicol. 7: 73-76
- Vogel E. (1987) Discussion Forum: Evaluation of potential mammalian genotoxins using Drosophila: the need for a change in test strategy. Mutagenesis, 2(3): 161-171
- Vogel E. y A. T. Natarajan (1979a) The relation between reaction kinetics and mutagenic action of monofunctional alkylating agents in higher eukaryotic systems I. Recessive lethal mutations and translocations in Drosophila melanogaster. Mutation Res., 62: 51-100
- Vogel E. y A. T. Natarajan (1979b) The relation between reaction kinetics and mutagenic action of monofunctional alkylating agents in higher eukaryotic systems II. Total and partial sex-chromosome loss in Drosophila. Mutation Res., 62: 101-123
- Vogel E., W. Blijleven, P. Klapwijk y J. Zijlstra (1980) Some current perspectives of the application of Drosophila in the evaluation of carcinogens. En: G. M. Williams, R. Kroes, H. Waaijers y K. Van de Poll (Eds.) The Predictive Value of Short-term Screening Tests in Carcinogenicity. Elsevier, Amsterdam, pp. 125-147

- Wiseman R. W., E. C. Miller, J. A. Miller y A. Liem (1987). Structure-activity studies of the hepatocarcinogenicities of alkenylbenzene derivatives related to estragole and safrole on administration to preweanling male C57BL/6J x C3H/HeJ F1 mice. *Cancer Res* 47: 2275-2283
- Wright A. (1980) The role of metabolism in chemical mutagenesis and chemical carcinogenesis. *Mutation Res.*, 75: 215-241
- Würgler F., H. Juon y H. Frei (1983a) Promutagens detected by a rapid test with Drosophila somatic cells (Resúmen). *Experientia*, 39: 686
- Würgler F., U. Graf, H. Frei y H. Juon (1983b) Genotoxic activity of the anti-cancer drug methotrexate in somatic cells of Drosophila melanogaster. *Mutation Res.*, 122: 321-328
- Zar J. H. (1983). *Biostatistical analysis*. Prentice Hall, Londres. 620 pp.
- Zijlstra J. A. (1987) Pharmacological and mechanistic aspects of chemically induced mutagenesis in Drosophila melanogaster. Tesis Doctoral. Druk: Krips Repro Meppel. 192 pp.
- Zijlstra J, A. y E. Vogel (1988) Metabolic inactivation of mutagens in Drosophila melanogaster. *Mutation Res.*, 198: 73-83