

7S
2EJ

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO



FACULTAD DE CIENCIAS

DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD
GENOTÓXICA DE DOS PLANTAS
MEDICINALES (*Thevetia thevetioides* y
Plantago major), EN LA PRUEBA SOMÁTICA
DE LAS ALAS DE *Drosophila melanogaster*

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

BIÓLOGO

P R E S E N T A :

MOISÉS MARTÍNEZ VELÁZQUEZ

DIRECTOR: M. en C. JULIÁN MALDONADO

290756



1999

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

FACULTAD DE CIENCIAS
SECCIÓN ESCOLAR





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

PAGINACION
DISCONTINUA.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

M. en C. Virginia Abrín Batule
Jefe de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis: DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD GENOTÓXICA DE DOS PLANTAS MEDICINALES (Thevetia thevetioides y Plantago major), EN LA PRUEBA SOMÁTICA DE LAS ALAS DE Drosophila melanogaster.

realizado por Moisés Martínez Velázquez

con número de cuenta 8834001-0 , pasante de la carrera de Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

✓ Director de Tesis M. en C. Julián Maldonado Luis
Propietario

✓ Propietario Dra. Patricia Ramos Morales

✓ Propietario Dra. María Cristina Pérez-Amador Barrón

✓ Suplente Dr. Adalberto Emilio Pimentel Peñalozza

✓ Suplente M. en C. María Guadalupe Ordaz Téllez

Edna María Suárez Díaz
Consejo Departamental de Biología

Dra. Edna María Suárez Díaz

DEPARTAMENTO
DE BIOLOGIA

Este trabajo fue realizado en su totalidad en el

Laboratorio de Genética

“Theodosius Dobzhansky” de la

Facultad de Ciencias de la

Universidad Nacional Autónoma de México

Con el apoyo otorgado por:

La Dirección General de Asuntos del Personal Académico

(DGAPA)

PAPIIT Proyecto: IN-207196-UNAM

y

La Dirección de Programas de Apoyo a la Docencia

PAPIME Proyecto: DO-200898

AGRADECIMIENTOS

Al director de tesis:

M. en C. Julián Maldonado Luis

Por su ejemplo de convicción

A los sinodales:

Dra. Patricia Ramos Morales

Dra. María Cristina Pérez-Amador Barrón

Dr. Adalberto Emilio Pimentel Peñaloza

M. en C. María Guadalupe Ordaz Téllez

Por sus valiosos y acertados comentarios y consejos en la revisión y corrección de esta tesis.

Agradezco de manera muy especial a Paty Ramos por haberme dado la oportunidad de conocer este campo de la Genética y por brindarme siempre su apoyo y estímulo.

A Lupita por toda la ayuda prestada y por su amistad.

A todos los compañeros del Laboratorio de Genética de la Facultad de Ciencias.

A todos los cuates de la generación.

A mis compañeros del Museo de las Ciencias Universum.

A Norma Paniagua por su amistad.

A todos mis profesores por haberme dado un poco de sí mismos.

Y a todas las *Drosophilas*.

DEDICATORIAS

A mis padres:

Ruperta Velázquez Flores (Doña Mayo)

Por todo lo que me has dado sin condición, porque gracias a tí he llegado hasta donde estoy ahora y por tu gran ejemplo en la lucha diaria. Gracias!!!

Jesús Martínez García

Por el amor que me demuestras día con día, por tu buen ejemplo y por tu apoyo.

A mis hermanos:

Jesús y René

Por darme siempre su cariño y buenos deseos.

A mi novia:

Patty Campos esta tesis te la dedico porque tú sabes todo lo que significa para los dos. Gracias por tu amor, tu apoyo y comprensión y por todas las experiencias compartidas. Eres lo mejor que tengo en la vida.

ÍNDICE

Pág.

RESUMEN	i
INTRODUCCIÓN	1
Uso de las plantas medicinales.....	1
Cáncer.....	2
Papel de las plantas en el tratamiento del cáncer.....	3
<i>Plantago major</i>	3
<i>Thevetia thevetioides</i>	10
<i>Drosophila melanogaster</i>	16
Prueba de mutación y recombinación somáticas (SMART).....	19
Descripción de los marcadores utilizados en la SMART.....	21
N-Nitrosodimetilamina.....	23
OBJETIVOS	25
MATERIALES Y MÉTODOS	25
Compuestos utilizados.....	25
Preparación de las infusiones.....	25
Líneas de <i>Drosophila</i>	26
Tratamientos.....	27
Fijación y elaboración de preparaciones.....	27
Registro microscópico de las alas.....	29
Criterios de lectura.....	30
Análisis estadístico.....	30
RESULTADOS	31
DISCUSIÓN	41
CONCLUSIONES	47
SUGERENCIA	47
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	48

RESUMEN

En los últimos años ha surgido un renovado interés por las plantas medicinales en todo el mundo; la herbolaria medicinal recobra una posición que parecía perdida después del surgimiento y auge de la industria químico-farmacéutica que, con sus numerosos medicamentos había revolucionado a la terapéutica. Se estima que en México la medicina tradicional se ha usado por casi 400 años y se conocen alrededor de 1000 especies vegetales. La mayoría de ellas han sido usadas para el tratamiento de enfermedades comunes o para tratar problemas básicos de salud mediante decocciones o infusiones. El valor medicinal de la planta curativa está asociado a la presencia de sustancias químicas las cuales tienen acción terapéutica definida y pueden emplearse para reducir o eliminar algunos trastornos patológicos originados por la enfermedad.

Entre las plantas que se mencionan en la literatura para combatir el cáncer, existen dos que llaman la atención: *Plantago major* y *Thevetia thevetioides*.

P. major, conocida comúnmente como llantén, se utiliza principalmente para disminuir la inflamación de estómago, paperas, llagas, golpes y heridas. También se emplea como analgésico contra el dolor de muelas, huesos, dolores reumáticos y los provocados por la artritis, además de usarse para tratar diversos tipos de cáncer.

T. thevetioides (huesito de fraile) es un arbusto del cual se utilizan las semillas para el tratamiento de afecciones de la piel: barros, espinillas; padecimientos bucales y problemas cardiovasculares como hemorroides y várices. De igual forma las semillas son usadas para combatir algunos tipos de cáncer.

Dado que estas plantas son utilizadas ampliamente por la población y tienen un posible valor terapéutico resulta interesante estudiarlas para profundizar en el conocimiento de sus propiedades y validar la seguridad en su uso.

En este trabajo se utilizó la prueba de mutación y recombinación somática que emplea células de las alas de *Drosophila melanogaster* para determinar la actividad genotóxica y antimutagénica de *Plantago major* y *Thevetia thevetioides*.

De la planta completa de *P. major* y de las semillas de *T. thevetioides* se probaron las infusiones y dos diluciones de las mismas: al 25 y al 50%.

Se ensayaron dos protocolos. En el primero de genotoxicidad (72 x 48 h) se utilizaron larvas + flr³/mwh + las cuales fueron expuestas a las soluciones de prueba. El segundo protocolo se utiliza para evaluar antimutagenicidad (72 x 6 x 48 h) y consistió en exponer a larvas + flr³/mwh + a un tratamiento por 6 horas con el agente alquilante N-Nitrosodimetilamina y posteriormente con las soluciones de prueba.

En ambos casos se corrió un lote testigo y de cada tratamiento se realizó al menos una repetición.

En las alas de las moscas adultas se registró el número, tipo y tamaño de las manchas recobradas y se compararon con X^2 a un $\alpha=0.05$.

Los resultados mostraron que las infusiones obtenidas de las dos plantas no indujeron genotoxicidad ni protegieron de los efectos mutagénicos de la N-Nitrosodimetilamina (DMN) en *D. melanogaster*. Se considera que durante la preparación de las infusiones los principios activos fueron inactivados o eliminados y esta es la causa de la aparente ausencia de respuesta.

INTRODUCCION

Uso de las plantas medicinales

Es indudable que en los últimos años ha surgido un renovado interés por las plantas medicinales en todo el mundo; la herbolaria medicinal recobra una posición que parecía perdida después del surgimiento y auge de la industria químico-farmacéutica que, con sus numerosos medicamentos había revolucionado la terapéutica. La gente olvidó que los productos químicos llamados drogas o fármacos, cuyo proceso de desarrollo abarca el último medio siglo provenían, en su mayoría, de las plantas medicinales que atesoraron las culturas médicas de muchos países en donde se habían usado desde tiempos inmemoriales.

La química y su impresionante evolución de las últimas décadas, parecía augurar que en el futuro, todo recurso para la salud provendría de la síntesis de compuestos obtenidos en el laboratorio y que las plantas medicinales pasaban a formar parte de románticos capítulos de la historia de la medicina.

Sin embargo, el tiempo mostró que tal expectativa no era fácil de cumplirse, que sin olvidar el alto grado de avance tecnológico que se ha alcanzado en todas las ramas de la ciencia, las plantas medicinales -vistas o no como materia prima- continuaban siendo el recurso fundamental para obtener los viejos y nuevos medicamentos; que la producción de fármacos era un procedimiento de alto costo, que requería de una tecnología sofisticada y que los países pobres, no obstante que eran los depositarios de la tradición herbolaria y dueños de la materia prima, no tenían acceso a los productos farmacéuticos elaborados o su adquisición se hallaba determinada por una dependencia económica, tecnológica y política de los centros de producción químico-farmacéutica (Lozoya y Lozoya, 1982).

En el curso de la historia la medicina herbolaria ha ofrecido diversas formas de mejorar el ánimo, consolar, calmar, dar fortaleza, serenar la mente y las emociones, pero también ha controlado afecciones físicas como las infecciones, inflamación, el vómito, la fiebre, el dolor y otras más. Por medio de aciertos y errores se aprendió que las plantas curaban; este conocimiento se transmitió de generación en generación y se incrementó con la experiencia (Del Amo, 1979; Muñoz, 1994).

En México, se estima que en la medicina tradicional se han usado por casi 400 años, alrededor de 1000 especies vegetales (Aguilar y Martínez-Alfaro, 1993). La mayoría de ellas han sido usadas para el tratamiento de enfermedades comunes o para tratar problemas básicos de salud, tales como: enfermedades respiratorias, problemas digestivos y de la piel, hipertensión, dolor o diabetes, o para inducir el sueño (Lozoya *et al*, 1987). La mayoría de las plantas son usadas como decocciones o infusiones por administración oral (Lozoya y Velázquez, 1988).

El valor medicinal de la planta curativa está asociado a la presencia de sustancias químicas llamadas principios activos, los cuales tienen acción terapéutica definida y pueden emplearse para modificar favorablemente los trastornos patológicos originados por la enfermedad (Cabrera, 1975; Muñoz, 1994).

Muchos de los principios activos son sumamente complejos y de algunos aún se desconoce la naturaleza química; otros han sido aislados, purificados, e incluso, sintetizados o imitados. Por lo general, pertenecen a una de estas seis categorías: alcaloides, glucósidos, aceites esenciales, gomas y resinas, aceites grasos y sustancias antibióticas (Thomson, 1980; Muñoz, 1994).

Cáncer

Cáncer es el término general que se aplica a una serie de enfermedades malignas que pueden afectar a partes muy diferentes del organismo. Estas enfermedades se caracterizan por la proliferación rápida e incontrolada de células anormales, capaces de formar un tumor o de distribuirse en el organismo, iniciando crecimientos anormales en otros lugares del mismo. Si el proceso no se detiene, puede progresar hasta causar la muerte del organismo. El cáncer se presenta, en general, en todos los animales superiores, aunque también las plantas desarrollan excrecencias que se asemejan al cáncer.

La cirugía, la radiación y los fármacos (agentes quimioterapéuticos) son las principales formas de tratamiento del cáncer en los seres humanos. En los últimos años se ha hecho un tremendo esfuerzo en la síntesis de fármacos anticáncer potenciales.

Un compuesto anticanceroso eficaz debe matar o incapacitar las células del cáncer sin producir daño excesivo a las células normales. Este ideal es difícil o, tal vez imposible de conseguir y por ello los pacientes con cáncer en tratamiento sufren desagradables efectos colaterales.

Estudios recientes sobre compuestos inhibidores de tumores de origen vegetal, están proporcionando una impresionante serie de nuevas estructuras químicas (Evans, 1991).

Papel de las plantas en el tratamiento del cáncer

Las plantas han sido utilizadas en el tratamiento de enfermedades malignas durante siglos; en una revisión global a la literatura científica tanto antigua como moderna, en que se describen plantas utilizadas contra el cáncer, se reúnen más de 1,400 géneros. El examen fitoquímico de plantas que han sido utilizadas empíricamente para el tratamiento del cáncer ha sido favorable, en cuanto al aislamiento de principios con actividad antitumoral.

En plantas superiores utilizadas en la quimioterapia del cáncer, el mayor éxito lo constituyen los alcaloides del *Catharantus roseus*: vinca-leucoblastina (vinblastina) y leurocristina (vincristina), los cuales se emplean, tanto solos como en combinación con otras formas terapéuticas para el tratamiento del cáncer; la vinblastina es útil principalmente en el tratamiento de la enfermedad de Hodgkin, cáncer que afecta a los ganglios linfáticos, bazo e hígado. La vincristina es clínicamente más importante que la vinblastina, sobre todo en el tratamiento de la leucemia infantil y es también el principal componente de diversos tratamientos combinados de alta eficacia (Evans, 1991).

Entre las plantas que se mencionan en la literatura para combatir el cáncer, existen dos que llaman la atención: *Plantago major* y *Thevetia thevetioides*.

Plantago major

Subclase: Sympetalae

Orden: Plantaginales

Familia: Plantaginaceae

Género: *Plantago*

Especie: *major*

Se le conoce comúnmente con los nombres de: antén, antena, cancerina, chile de pato, diantén, diastén, hierba del manzo, hojas de lantes, lanté, lantén, lanter, lantey, lengua de vaca, lenteja, lentem, llanté, llantel, llantén, mucilago, plantén, yantén. En Chiapas: yok tje; en

Michoacán: yures xukuri (purhépecha); en Puebla: snoktail (totonaco); en Yucatán: xiw kin.

Botánica y ecología

Es una planta anual o perenne, que mide de 10 a 30 cm de altura, con pequeños camotes. Tiene las hojas en forma de roseta (surgen desde el nivel del suelo), envolviendo parte del tallo; el envés de la hoja es más ancho que el haz. Las flores son diminutas y de color blanco-verdosas, acomodadas en una espiga larga, dando la apariencia de una mazorca delgada (fig. 1); las semillas son de color café.

Es originaria del Norte de Europa y Centro de Asia, se presenta en climas cálido, semicálido y templado y desde el nivel del mar hasta los 3500 m. Se encuentra asociada a terrenos de cultivo, bosques tropicales caducifolio, subcaducifolio y perennifolio, bosque espinoso, matorral xerófilo, pastizal y bosques mesófilo de montaña, de encino, de pino y mixto de pino-encino.

Etnobotánica

A nivel nacional, la mayoría de los usos reportados para el llantén corresponden a padecimientos digestivos, sin embargo se pueden distinguir de manera general dos grupos de acuerdo a las propiedades que se le atribuyen de manera explícita: en el primero desempeñando una acción desinflamante y en el segundo como analgésico; en el resto de los padecimientos, desempeñará una o ambas funciones.

Como desinflamatorio se le emplea en diversos padecimientos, principalmente en inflamación de estómago o abdomen, paperas, llagas, golpes y heridas e inflamación de ojos. Para la inflamación del estómago se bebe la infusión de las hojas. El tratamiento empleado para inflamaciones o lesiones aparentes, por lo general es la aplicación externa y local ya sea del cocimiento de las hojas mediante compresas, fomentos, cataplasmas, lavados o directamente de la hoja machacada, sola, untada con algún aceite o pomada o frotada directamente con alcohol. Destaca así mismo su empleo como analgésico en diversas dolencias. Por vía oral se ingiere para el dolor de estómago, de riñón, de cabeza y de manera local para dolor de muelas, de pies, de huesos, dolores reumáticos y los provocados por la artritis. Por lo que se refiere a otros padecimientos relacionados con el aparato digestivo, se tiene su empleo generalizado en numerosas entidades del país para el tratamiento de la disentería, amibas y diarrea. Tanto para la disentería, como para la diarrea se acostumbra beber el cocimiento de la planta completa o sólo las hojas o la flor, en



Figura 1. *Plantago major*.

ocasiones combinado con otra planta o sustancia. En algunas regiones del país se le emplea en algunas parasitosis, para la inflamación de estómago causada por parásitos intestinales y como antihelmíntico. Además se usa para la bilis y desórdenes biliares, para úlceras de la boca y contra las caries, gastritis, vómito y de manera externa en diversas afecciones cutáneas. El llantén se emplea en algunas afecciones respiratorias como anginas; tos; asma, bronquitis y catarro. También para problemas urinarios, para los riñones y en problemas oculares. Se le utiliza además para hemorragias o hemorragias internas. Otros usos medicinales son como antipirético y para tratar el cáncer, en infecciones vaginales y como antiabortivo. Así mismo en casos de diabetes y para problemas de crecimiento en niños (Argueta *et al*, 1994).

En Bahía, Brasil, el 2 % de la población utiliza a *P. major* para tratar las úlceras provocadas por *Leishmania (Viannia) braziliensis* (Franca *et al*, 1996).

Química

Las hojas y las semillas del llantén, han sido los órganos más estudiados de esta planta desde el punto de vista químico. Los flavonoides: apigenina, baicaleína, el galactósido de herbacetina, hispidulina, el campferol y su rutinósido, luteolina, miricetina, nepetina, quercetina y dos glicóridos de quercetina: escutelareína y ácido siríngico han sido detectados en las hojas; así como los monoterpenos aucubina y dos glicóridos y los componentes aromáticos: ácido cinámico y varios derivados y los ácidos clorogénico y ferúlico (Argueta *et al*, 1994). También en las hojas se han detectado iridoides y fenoles, ácidos fenólicos y ésteres fenilpropanoicos de glucósidos (verbascósido y plantamajósido). La semilla contiene ácidos grasos comunes en semillas oleaginosas comestibles, goma, mucílago (araboxilán rico en ácido urónico), una resina y taninos; los monoterpenos aucubósido, melitósido; dos alcaloides monoterpénicos, plantagonina e indicaina; los triterpenos alfa y beta-amirina y los esteroides beta-sitosterol, estigmasterol y campesterol. En las flores sólo se ha identificado el monoterpene esperulósido (Argueta *et al*, 1994). También se ha encontrado en bajas cantidades un componente tóxico: el ácido erúrico, en una concentración de 3.45 % (Gui *et al*, 1997).

Farmacología

La evaluación experimental de las propiedades citotóxicas y antitumorales de diversos tipos de extractos de las partes de la planta han dado algunos resultados positivos y otros negativos.

Tapia *et al* (1996), usando cultivos *in vitro* de *Escherichia coli* y *Candida albicans* encontraron que los extractos de *P. major* no presentaron actividad antibacteriana ni antimicótica, respectivamente. Basaran *et al* (1996) probaron un extracto y varias fracciones de *P. major* con resultados negativos en las cepas TA98 y TA100 de *Salmonella typhimurium* con o sin activación metabólica. Ha sido reportado que una tintura preparada a partir de hojas secas resultó con efecto antibiótico positivo frente a *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, aisladas de pacientes con conjuntivitis (Argueta *et al*, 1994). En *Aspergillus nidulans* no indujo efecto genotóxico una infusión y un extracto alcohólico obtenidos de *P. major* (Ramos *et al*, 1996), mientras que un extracto de diclorometano preparado a partir de la planta entera mostró una débil actividad antimalárica frente a *Plasmodium falciparum*, con dosis de 49 mcg/ml. (Argueta *et al*, 1994). Ponce *et al* (1994), probaron un extracto de *P. major* en la viabilidad de trofozoitos de *Giardia duodenalis* y encontraron un efecto *in vitro* claramente positivo contra este parásito. Por otra parte, al adicionar las partes aéreas de la planta en un 40 % en la dieta administrada a ratones hembras, se indujo una débil actividad retardadora del crecimiento de los animales tratados por 22 días (Argueta *et al*, 1994), en tanto que un extracto etanólico (al 95 %) preparado con las hojas y que fue administrado diariamente por cinco días a ratones por la vía intraperitoneal (0.20 mg/kg), presentó actividad antitumoral frente a tumores del tipo Sarcoma 180 (ascites) (Argueta *et al*, 1994). Varios estudios reportan que la administración a ratas de un extracto acuoso de las hojas, por vía intragástrica e intravenosa, provocó un descenso en la presión arterial de los animales de experimentación; mientras que la evaluación de este mismo extracto acuoso de hojas en músculo espiral de tráquea de cobayo provocó un efecto relajante del músculo liso, aún en presencia de serotonina, histamina o acetilcolina. Por su parte, la dosis de 50 mg/kg administrada por vía subcutánea en ratas con el píloro ligado, provocó una disminución en el número de úlceras e índice de ulceraciones (Argueta *et al*, 1994). Los feniletanoides: acteósido y plantamajósido, aislados de *P. lanceolata*, mostraron efectos inhibitorios en el edema de oreja de ratón inducido por el ácido araquidónico (Murai *et al*, 1995) y la administración de fluido intracelular de *P. major* a ratones hembras de la cepa C3H Strong mediante inyecciones subcutáneas provocó una disminución del 80.49 % en la formación de tumores (Lithander, 1992). La inclusión en la dieta de ratas -tratadas con amidopirina y nitrito de sodio- del complejo polifenólico de *P. major* -plantastina- redujo el daño tóxico en el hígado y

disminuyó la formación de tumores en un 61.9 % (Karpilovskaia *et al*, 1989). En otro ensayo, Shipochliev *et al* (1981) utilizaron ratas albinas de la cepa Wistar, a las cuales se les produjo inflamación mediante la inyección simultánea de caraginan y prostaglandina E1, para evaluar la actividad antiinflamatoria de un extracto de *P. major*. Ellos encontraron que el extracto suprimió tanto el efecto inflamatorio, como la infiltración de leucocitos. Por otra parte, una decocción de hojas de *P. major*, administrada a ratas por vía nasogástrica a la dosis de 1 g/kg, dió actividad diurética (Argueta *et al*, 1994). En 1981, Shipochliev estudió el efecto de un extracto de *P. major* como potenciador del tono uterino, usó una preparación de trompa uterina de conejo y otra de cerdo de guinea aisladas; la concentración final que probó fue de 1 a 2 mg por cm³ de tejido, encontrando un efecto positivo al aumentar el tono en el útero. En conejos se ha demostrado experimentalmente que varias fracciones cromatográficas obtenidas de las hojas de *P. major* tienen un efecto acelerante de la cicatrización. Un extracto etanólico de las hojas resultó positivo en experimentos para evaluar su efecto en la disminución del colesterol en conejos a los que se les administraron hasta 500 mg/kg, aunque esta actividad se clasificó como débil (Argueta *et al*, 1994). Suhonen *et al* (1983) describen una severa reacción anafiláctica provocada por la ingestión de semillas de *P. ovata*, constituyentes principales de varios laxantes. La hipersensibilidad a las semillas fue confirmada con la prueba de piel y RAST (radioalergosorbent test), aunque no se mencionan detalles del sistema de prueba utilizado. Para evaluar las propiedades de *P. major* también se han realizado experimentos con cultivos celulares y directamente en el humano. Así, un extracto preparado con las hojas dió actividad citotóxica en experimentos con cultivos de células de CA Ehrlich-sólida y Sarcoma 180 (sólido) (Argueta *et al*, 1994) y hubo una estimulación en la producción de leucocitos *in vivo* al utilizar varios extractos de *P. major* (Tapia *et al*, 1996). Un ensayo clínico realizado con voluntarios humanos en Tailandia, comprobó el efecto de una decocción preparada con la planta entera para disolver los cálculos renales. Los tres pacientes que se reportan en este ensayo, fueron tratados por espacio de dos a seis meses, dos veces por semana con una dosis de 97.5 g/día (peso seco de la planta) (Argueta *et al*, 1994). Doan *et al* (1992) evaluaron el efecto diurético de *P. major*, sin embargo no observaron alguna influencia en la producción de orina a las 12 y 24 horas ni en la excreción de sodio en un placebo controlado. Otros estudios experimentales confirmaron un efecto espástico sobre el músculo liso de los bronquios, en 25 pacientes que presentaban bronquitis

crónica. El periodo de tratamiento fue de 25-30 días y no mostró efecto tóxico en el tracto gastrointestinal, hígado, riñones y hematopoyesis (Matev *et al*, 1982). También se demostró en humanos una acción gastroprotectora y laxante de la fracción poliholocídica obtenida tanto de las semillas como de las hojas de *P. major*, *P. media* y *P. lanceolata* (Hriscu *et al*, 1990) y se comprobó el papel protector y retenedor de agua de su mucílago y el papel potencial de los iridoides en la actividad antiinflamatoria (Bruneton, 1995). Otras actividades evaluadas en ensayos clínicos en humanos para las cuales se han obtenido respuestas positivas de actividad biológica son: su efecto disuasivo en el hábito de fumar, probado en forma de aerosol preparado a partir de la planta entera; la actividad antiprurítica de las hojas, demostrada en voluntarios humanos sufriendo de dermatitis provocada por hiedra venenosa; así como la actividad antihemorrágica y los efectos estrogénicos y progestagénicos de las semillas. El efecto laxante de las semillas de la variedad *cruenta* de esta especie se comprobó en humanos adultos tratados por vía oral con una dosis de 0.5 g de semillas/persona (Argueta *et al*, 1994).

Toxicidad

Se ha estimado que un extracto acuoso de la hoja, administrado a ratas por la vía intravenosa indujo una dosis letal media de 175 mg/kg de peso, mientras en un estudio para observar la actividad nefrotóxica de las partes aéreas de la planta cuando se administraron por 22 días a ratones hembras, en una proporción del 40 % de la dieta, se observaron resultados negativos (Argueta *et al*, 1994). La FDA (Food and Drug Administration) ha clasificado a *P. major* como una planta de seguridad indefinida (Duke, 1985).

Componentes químicos que destacan en *Plantago sp.*

Gomas y mucilagos

El término goma o mucílago usualmente se refiere a macromoléculas de polisacáridos que se disuelven al contacto con el agua para formar soluciones coloidales o geles. Los mucilagos se consideran constituyentes normales de las células, que preexisten en formaciones histológicas especializadas (células o canales) los cuales son comunes en el tegumento externo de las semillas (Bruneton, 1995).

Hay varias especies del género *Plantago* que muestran propiedades laxantes debido a que poseen polisacáridos hidrofílicos. La semilla de *P. ovata*, *P. psyllium* y *P. major* se caracteriza por

presentar efectos laxantes; su efecto, confirmado por varios estudios clínicos, es puramente mecánico y ligado a su mucilago; las macromoléculas de polisacárido absorben agua y forman un gel voluminoso que incrementa la masa, estimula la peristalsis y facilita los movimientos del intestino. Varias publicaciones reportan la actividad metabólica de estos mucílagos, especialmente los de *P. ovata*, los cuales tienden a disminuir los niveles de colesterol y azúcar en la sangre.

Las semillas de *P. psyllium* y *P. ovata* no inducen efectos colaterales (eventualmente pueden causar una sensación de hinchazón), su toxicidad es insignificante (Bruneton, 1995).

Thevetia thevetioides

Subclase: Sympetalae

Orden: Gentianales

Familia: Apocynaceae

Género: *Thevetia*

Especie: *thevetioides*

Se le conoce comúnmente con los nombres de: cabalonga, calaverita (Oax.), cabrito (Jal.), codo de fraile, hueso de fraile, huevos de gato, rejargar (en Paramita, Nay.), venenillo, yerba del yoyote, yoyotli (Gro.).

Morfología y distribución

Es un arbusto que mide de 3 a 9 m de altura; el tallo es de color gris. Las hojas son angostas y miden hasta 15 cm de largo y de 6 a 10 mm de ancho. La corola es de 8 a 9 cm de largo, de color amarillo. Las flores son amarillas y aparecen en racimos que tienen pocas flores (fig. 2). Los frutos son globosos, de unos 4 cm de longitud, 3 de ancho y 3 de grueso y tienen una semilla café claro

Es originaria de América tropical. Habita en Tamaulipas, Veracruz, Oaxaca y Guerrero, en climas cálidos entre los 1000 y los 1500 msnm y se cultiva en huertos familiares y solares. Se encuentra asociada a bosque tropical subcaducifolio y matorral xerófilo.

Etnobotánica

Este arbusto se recomienda para el tratamiento de afecciones de la piel: barros, espinillas (Morelos); de padecimientos bucales: dolor de muelas y caries; problemas vasculares como hemorroides y várices. Para estos dos últimos casos, en Michoacán, se recomienda moler la semilla



Figura 2. *Thevetia thevetioides*. a) rama con inflorescencia, b) fruto.

con vaselina y aplicar la pomada en la parte afectada. Se refiere también que esta especie sirve para quitar el dolor de piquete de alacrán y la tos ahogadora. Se emplea contra algunas enfermedades culturales como el "ojo en niños" y la "mollera caída" (Argueta *et al*, 1994).

Desde hace mucho tiempo se ha usado empíricamente el jugo lechoso de la planta para el tratamiento de la sordera, las úlceras y las enfermedades de la piel; las hojas se han empleado para calmar los dolores de muelas y disolver tumores. Actualmente se prepara una pomada de las semillas del huesito de fraile, mezcladas con grasa, para tratar las hemorroides (Villacis, 1978).

De igual forma, las semillas de esta planta se han utilizado empíricamente en el tratamiento del cáncer. García (1991) menciona que para combatir un cáncer externo, se lava la parte afectada con una infusión de 10 gramos de semillas en 1/2 litro de agua; y si es interno, se bebe una taza chica de la misma infusión.

Química

Las semillas contienen un 40 % de aceite fijo no secante, caseína vegetal, materia extractiva, el glucósido thevetina (0.84 %), y los alcaloides thevetosa y thevetioidina. También se ha obtenido una sustancia llamada pseudoindicán y se han identificado los cardenólidos nerifolín y su acetato, y el esteroil daucosterol (Martínez, 1959).

Farmacología

T. thevetioides comparte con el resto de las especies de este género la característica de poseer semillas venenosas y es común encontrar en la literatura reportes de envenenamientos tanto accidentales como provocados en animales y humanos. En 1990, Pahwa y Chatterjee evaluaron los efectos de *T. neriifolia* en ratas alimentadas con las semillas; éstas fueron exprimidas e incluidas en el alimento a concentraciones de 20 y 30 %. El alimento fue dado por un máximo de 10 días o hasta que provocó la muerte. Los principales signos de envenenamiento fueron: parálisis de los miembros posteriores, enrrollamiento del cuerpo en su eje longitudinal, golpeo circular de la cola, tirones musculares, convulsiones tetánicas, temblores, colapso y la muerte. Los autores también observaron reducción significativa en el peso de las ratas. La mortalidad observada fue de 16/20 y 18/20 con respecto a las concentraciones antes mencionadas. Además se encontró reducción estadísticamente significativa en hemoglobina, eritrocitos, leucocitos y neutrófilos y un aumento en el número de linfocitos; de igual manera se observó disminución en la glucosa de la sangre y en las proteínas del

suelo. Los estudios histopatológicos mostraron cambios inflamatorios y degenerativos en hígado y riñón. Los principales cambios en el hígado fueron: metamorfosis grasa de moderada a severa, congestión, hepatocitolisis, degeneración nuclear, picnosis y necrosis. La proliferación celular del endotelio glomerular, hiper celularidad de los glomérulos, necrosis del epitelio tubular replegado, desaparición del núcleo y picnosis fueron los cambios importantes observados en la región cortical del riñón. Atrofia, erosión y cambios inflamatorios fueron observados en las membranas mucosas del estómago. El extracto etanólico presentó un efecto tóxico general en ratón con leucemia-P388 y melanoma-B16 cuando se administró por vía intraperitoneal a una dosis de 100 mg/kg (Suffness *et al*, 1988). Zhang *et al* (1994), realizaron un estudio de actividad antitumoral en 6 tipos de tumores de roedores *in vivo* como tumores ascíticos H22, EAC, P388, y tumores sólidos S180, U14 y carcinoma de pulmón de Lewis, los cuales fueron tratados con el thevetósido que se presenta en las semillas, a 1.5 mg/kg-1/d-1 solo o combinado con clorometano, el cual es un compuesto carcinogénico (Index Merck, 1989) a 0.3, 0.5 o 1.0 mg/kg-1/d-1. El thevetósido sólo, indujo inhibición marcada en el crecimiento de 3 tipos de tumores sólidos con tasas de inhibición de 48.7-56.7 %. El efecto de la terapia combinada fue mucho más pronunciado que el de la administración independiente. La esperanza de vida bajo la terapia combinada se incrementó de 82.4 a >122.1 %. Para los tumores sólidos, la administración combinada dió tasas de inhibición de 65.6-72.5 %. En gatos, la administración intracerebroventricular de 5, 10 y 20 mg de peruvósido, un glucósido cardiaco obtenido de *T. nerifolia*, produjo una marcada neurotoxicidad. La perfusión en los ventrículos laterales de peruvósido produjo una liberación masiva de 5-hidroxitriptamina (5-HT) (Gaitonde y Joglekar, 1977). En otro estudio también se reportó citotoxicidad de un extracto etanólico del arbusto completo y una fracción cromatográfica, al ser probado en un cultivo de células con carcinoma 9KB (Argueta *et al*, 1994). En cuanto a la toxicidad de las semillas de *Thevetia* en humanos, los reportes abundan. Saraswat *et al* (1992) estudiaron la presentación clínica, el curso y el manejo de 13 pacientes suicidas envenenados con semillas de *T. peruviana*. Los pacientes que ingirieron tan sólo dos semillas presentaron efectos tóxicos gastrointestinales y cardiovasculares. Estos pacientes respondieron bien al tratamiento sintomático y de soporte, ya que ellos ingirieron menos de cuatro semillas y se reportaron en el hospital dentro de las cuatro horas siguientes a la ingestión. Los resultados no fueron tan alentadores cuando los pacientes ingirieron

más de cuatro semillas y se reportaron después de las cuatro horas siguientes a la ingestión; la causa de muerte en todos estos pacientes fue un choque cardiogénico. Ahlawat *et al* (1994) reportaron 3 casos de envenenamiento en humanos provocado por la ingestión de *T. peruviana*. De igual forma Saravanapavanathan y Ganeshamoorthy (1988) reportaron el estudio de 170 casos de envenenamiento causado por *T. peruviana* en el Norte de Sri Lanka. Pathare *et al* (1987), Ansford y Morris (1981) y Bhattacharya *et al* (1976) describieron tres casos de envenenamiento provocados por la ingestión de semillas de *T. cerebra*, *T. Peruviana* y *T. neriifolia* respectivamente. En otro estudio Samal *et al* (1989) reportaron cuatro casos de envenenamiento provocado por *T. cerebra*, en los cuales observaron ictericia y falla renal. Además, en estudios *postmortem* ellos encontraron necrosis renal tubular, patología glomerular y cambios en el hígado y cerebro. Mientras tanto en Australia se realizó una encuesta que duró aproximadamente 7 años, para conocer la frecuencia con que ocurrían envenenamientos provocados por *T. peruviana*; sólo se consideraron a los niños, desde recién nacidos hasta los 12 años de edad y el resultado fue de 0.62 por cada 100,000 personas (Shaw y Pearn, 1979). Los autores además describieron una serie de casos de 13 niños envenenados con *T. peruviana*. Por otro lado, Guicheney *et al* (1969) reportaron varios casos de intentos suicidas que siguieron el mismo procedimiento. Además de la acción tóxica de la semilla, se ha comprobado su acción analgésica en el hombre, por medio de pomadas hechas a base de las almendras (semillas peladas), mediante aplicación topical (Martínez, 1959).

Principios activos

Se describe en la literatura que la thevetosa tiene acción cardiotónica similar a los compuestos digitálicos, pero es permanentemente tóxica (Martínez, 1959).

Componentes químicos que destacan en *Thevetia sp.*

Glucósidos cardiacos

Existe un pequeño grupo de drogas llamado heterósidos vegetales de uso terapéutico para el tratamiento de la insuficiencia cardiaca. El término "heterósido" o "glucósido" es muy general y comprende todo el variado conjunto de combinaciones de azúcares con geninas. Los heterósidos cardiacos presentes en las plantas parecen estar limitados a las Angiospermas. Los cardenólidos son los más comunes y abundan particularmente en Apocynaceae y Asclepiadaceae. Algunos de los principales géneros que contienen heterósidos cardiacos son los siguientes: *Strophantus*, *Apocynum*,

Thevetia, Nerium, Calotropis, Asclepias, Convallaria y *Digitalis*.

Pueden distinguirse dos tipos de geninas, según posean un anillo lactónico pentagonal o hexagonal. Estos tipos se conocen con los nombres respectivos de cardenólidos (por ejemplo, digitoxigenina) y bufadienólidos o bufadienólidos (por ejemplo, escilarenina) (fig. 3).

La eficacia farmacológica de los heterósidos cardio-activos, depende, tanto de las geninas, como de los azúcares unidos a ellas; la actividad específica reside en las geninas, pero los azúcares hacen a los compuestos más solubles e incrementan el poder de fijación de los heterósidos al músculo cardíaco (Evans, 1991).

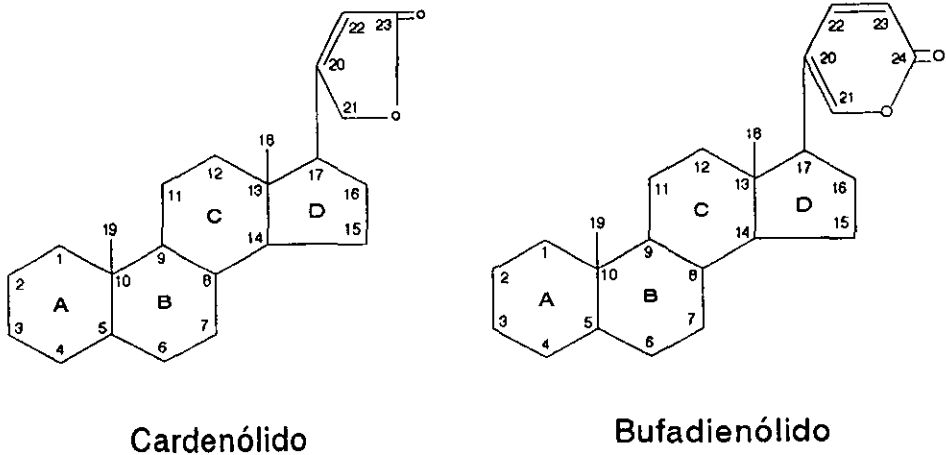


Figura 3. Estructura y numeración de los dos tipos de geninas presentes en los heterósidos cardíacos.

Drosophila melanogaster

Los modelos experimentales que se emplean para la caracterización genotóxica son muy variados, tanto por el o los organismos que se utilizan, como por los eventos biológicos que detectan (International Programme on Chemical Safety, 1985). Uno de estos modelos de experimentación lo constituye *D. melanogaster*.

La “mosca de la fruta” es un insecto que pertenece al orden Diptera y está ampliamente distribuida en el mundo, por lo que se le encuentra en todo tipo de clima, altitud y latitud. Entre las ventajas que se han señalado para su uso destacan: la facilidad para realizar cultivos experimentales, la corta duración de su ciclo de vida (ya que dura de 10 a 12 días a 25°C), la distinción clara entre cada una de las fases de su ciclo de vida, la gran cantidad de descendencia que produce una sola pareja, y también el hecho de que su mantenimiento requiere poco espacio y es de costo reducido (Ramos *et al*, 1993). La presencia de un paquete enzimático en la fracción microsómica semejante a la del hígado de mamíferos, permite la biotransformación *in vivo* de los compuestos (Baars *et al*, 1980).

Ciclo de vida

El desarrollo de *D. melanogaster* presenta un período de embriogénesis dentro del huevo y una sucesión de estadios larvales que culminan con una metamorfosis completa (holometábola), de la cual surge un imago o adulto. La secuencia y duración de los diferentes estadios en el ciclo de vida son: huevo, un día; larva de primer estadio, un día; de segundo, un día, y de tercero, un día; pupa, 4.5 a 5 días. La duración del ciclo de vida completo es de 10 días en condiciones controladas de temperatura (25°C) y humedad relativa (60 %) (Zimmering, 1976) (fig. 4).

La penetración del espermatozoide tiene lugar a través de una abertura llamada micropilo que se encuentra en el extremo anterior del óvulo. Los espermatozoides quedan almacenados en la hembra después de la cópula; luego de la fecundación los huevecillos quedan en el útero durante los estadios más tempranos del desarrollo embrionario y posteriormente se depositan en el medio de cultivo. El huevo es de color blanco lechoso, tiene una longitud promedio de 420 micras, la superficie dorsal es aplanada y la ventral algo convexa, tiene un par de filamentos delicados que son

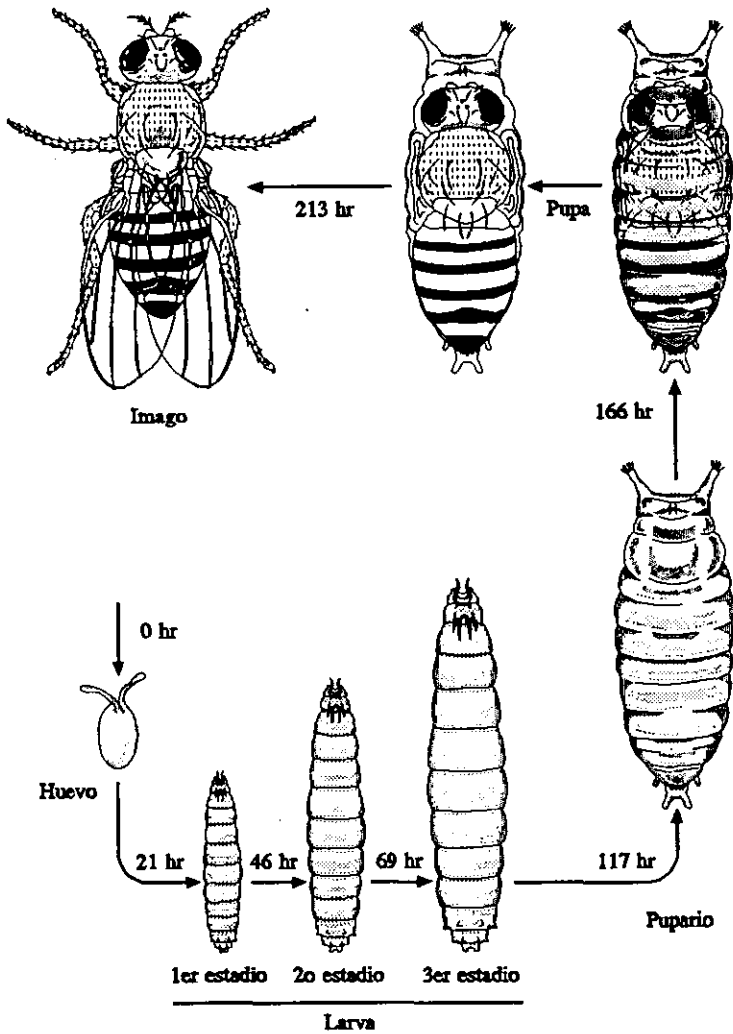


Figura 4. Ciclo de vida de *Drosophila melanogaster*.
(Tomado de Maldonado, 1997).

extensiones del corion situados en la región anterodorsal, los cuales impiden que se hunda el huevo en la superficie blanda del medio de cultivo (Demerec, 1969).

Después de un día de desarrollo embrionario, eclosiona del huevo una pequeña larva. La larva presenta dos linajes celulares diferentes: las células larvarias y las células imagales. Las células larvarias forman el cuerpo de la larva, se caracterizan porque han perdido la capacidad de división y sólo aumentan su volumen; en algunas se presentan cromosomas politénicos, son poliploides y están determinadas y diferenciadas genéticamente (Demerec, 1965; Wilkins, 1986; Pomerai, 1990).. Las segundas no están involucradas en la formación del cuerpo de la larva y son distinguibles de las primeras porque las células imagales tienen tamaño pequeño, constitución cromosómica diploide, retienen la capacidad de división celular y están determinadas genéticamente pero se diferencian hasta que la larva entra a la metamorfosis (Pearson, 1974); estas células se localizan en estructuras características denominadas discos imagales, los cuales son primordios celulares que incrementan su tamaño al multiplicarse el número de células mediante divisiones mitóticas que ocurren en momentos particulares durante el desarrollo larvario (Madhavan y Schneiderman, 1977).

En la última muda larvaria, que es delgada y blanquecina al principio y se endurece y torna oscura posteriormente, se forma el pupario. Durante la metamorfosis, la hormona ecdisona desencadena una serie de cambios en el organismo, los cuales involucran la destrucción de ciertos tejidos y órganos larvarios (histólisis) y la organización de las estructuras del adulto a partir de los discos imagales. La mayor parte de los órganos del adulto se forman a partir de los discos imagales ya presentes en la larva o por células larvarias que se diferencian al ocurrir la reorganización del estado pupal (fig. 5). El estado pupal toma de 3 a 5 días y termina cuando emerge el imago o adulto (Demerec, 1965).

El imago rompe el extremo anterior del pupario, por donde sale. Al principio el cuerpo de la mosca es alargado, sin el pigmento característico y tiene las alas totalmente plegadas; durante una hora aproximadamente la mosca inyecta linfa a las alas (que son una especie de sacos que se extienden en forma gradual hasta quedar turgentes), el contacto con el aire seca las alas que posteriormente son vaciadas al excretar la mosca el exceso de linfa. A medida que pasan las horas el adulto adquiere su color característico. Ésta es la etapa reproductiva; el imago alcanza la madurez

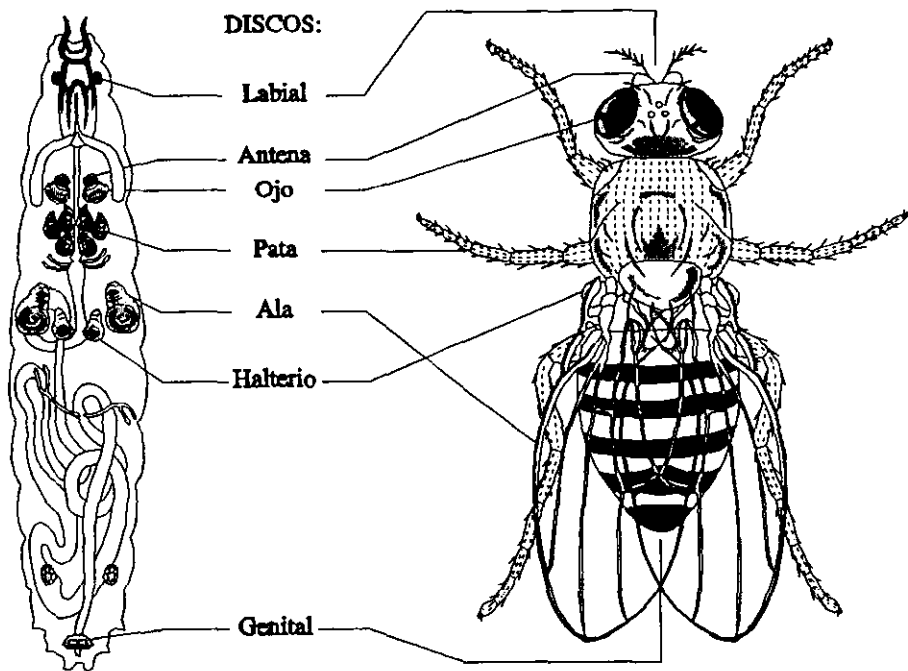


Figura 5. Estructuras formadas a partir de los discos imaginales de la larva de *Drosophila* (Tomado de Maldonado, 1997).

sexual a las 8 o 9 horas de edad ((Demerec, 1965; Wilkins, 1986).

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 somáticas (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; Maldonado, 1997).

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

Entre las ventajas con que cuenta este sistema se encuentran: el tiempo del ensayo es sólo de una generación (10 días) y además permite analizar un gran número de células blanco ($\approx 1,000,000$) en un tamaño de muestra de 40 alas (García-Bellido y Merriam, 1974; Graf *et al.*, 1983).

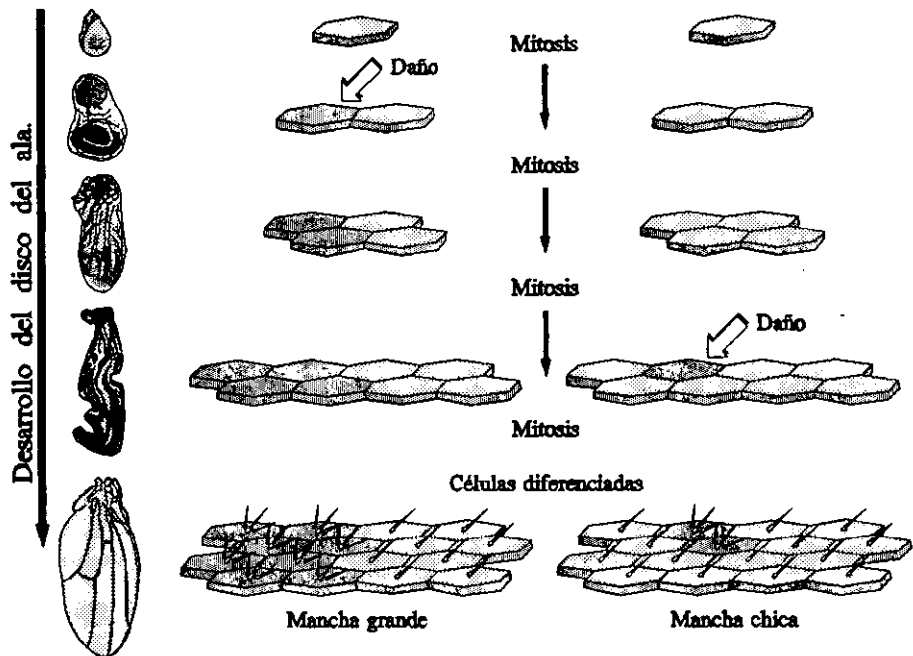


Figura 6. Formación de clones celulares durante el desarrollo del disco imagal del ala (Tomado de Maldonado, 1997).

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 normales en la superficie del ala. 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 (fig. 6) (Würgler *et al*, 1983 b).

Descripción de los marcadores utilizados en la SMART

Los marcadores utilizados en la prueba de mutación y recombinación somáticas (SMART) son autosómicos recesivos y se localizan en el brazo izquierdo del cromosoma tres.

El marcador flare, (*flr*³) (3-39-0) es una mutación que en condición homocigótica es letal, pero resulta viable a nivel celular en mosaicos somáticos, produciendo alteraciones en los tricomas dando el aspecto de una flama o como manchas quitinosas sobre la superficie de las alas. El cromosoma balanceador (TM3, *Ser*) se utiliza para mantener estable en los cultivos al alelo *flr*³, este cromosoma porta múltiples inversiones que abarcan casi su totalidad y que impiden recobrar productos viables del proceso de recombinación en el cromosoma tres.

El alelo marcador del cromosoma balanceador es *Serrate* (*Ser*) que es fácilmente distinguible porque produce muescas en los bordes terminales de las alas, es totalmente dominante sobre el silvestre *Ser*⁺, su expresión es variable y los organismos homocigóticos para *Serrate* mueren, lo que permite recuperar sólo a los portadores del marcador *flr*³ y el cromosoma balanceador (Lindsley y Zimm, 1992; Graf *et al*, 1984).

La mutación múltiple 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 (Lindsley y Zimm, 1992).

Las alteraciones detectadas en la SMART pueden originarse por varios eventos: mutación, delección, pérdida cromosómica o recombinación, y se expresan como manchas sencillas con uno u

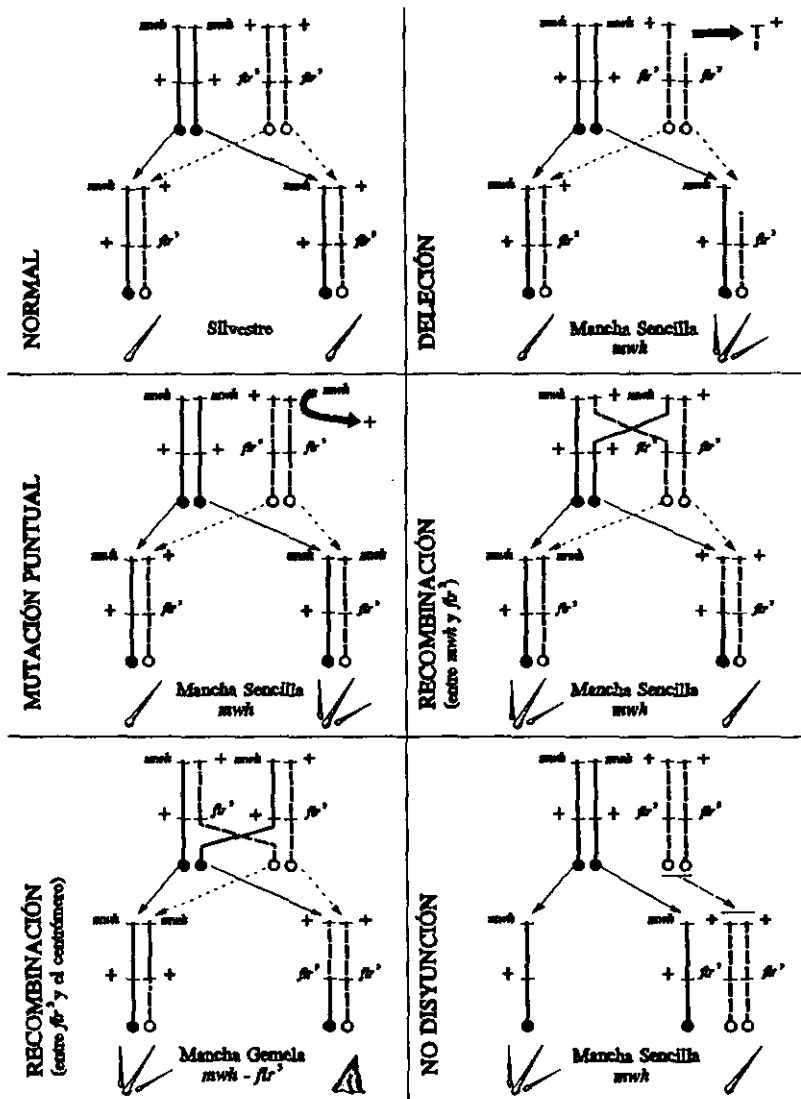


Figura 7. Eventos genéticos detectables en SMART (Tomado de Maldonado, 1997).

otro de los fenotipos *mwh* o *flr*³. Un evento de recombinación entre *mwh* y *flr*³ puede dar como resultado una mancha sencilla *mwh*. Sin embargo la recombinación entre *flr*³ y el centrómero (3-47.7), da lugar a manchas gemelas *mwh/flr*³ (fig. 7); debido a lo anterior, las manchas gemelas permiten diferenciar la actividad de compuestos recombinogénicos (Graf *et al*, 1984).

N-Nitrosodimetilamina (DMN).

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 de prueba y se conoce gran parte de su actividad genotóxica y los mecanismos por los que son biotransformados por los seres vivos (fig. 8), 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 (Maldonado, 1997).

La DMN es un líquido amarillo de baja viscosidad, miscible en agua, soluble en la mayoría de los disolventes orgánicos y en lípidos, muy volátil, su fórmula química es: $(\text{CH}_3)_2\text{NNO}$ (fig. 8); está formada por C (32.42 %), H (8.16 %), N (37.82 %) y O (21.60 %), peso molecular: 74.08 g, densidad: 1.0048 (Index Merck, 1989). Es usada como disolvente en la industria del plástico y la fibra, como antioxidante, aditivo para lubricantes y en condensadores para incrementar la constante dieléctrica, también se usa como nematocida. Se ha encontrado en pequeñas cantidades en muestras de humo condensado de tabaco, en carnes curadas como el tocino, el pescado salado y ahumado. Asimismo se utiliza como disolvente y en la síntesis del combustible 1-1 dimetilhidrazina (Index Merck, 1989).

Es un agente alquilante y carcinógeno potente (EMS, 1976), induce tumores en diferentes sitios según la ruta de administración, por ejemplo, dosis de 25 y 50 ppm de la DMN en la dieta de conejos ocasionan carcinomas hepatocelulares; ratas sometidas a inhalación repetida de la DMN muestran tumores en las cavidades nasales y en el riñón; cuando se administra por vía oral a diferentes líneas de ratones provoca sarcomas, carcinomas y adenomas en pulmón; en *Drosophila* induce mutaciones letales recesivas ligadas al sexo y pérdida cromosómica (Vogel y Natarajan, 1979 a y b; Ordaz, 1998). El descubrimiento de la actividad carcinogénica de la DMN ha permitido

establecer que los compuestos N-nitroso y otros agentes alquilantes constituyen una clase importante de compuestos carcinogénicos. El contacto humano a agentes alquilantes es exógeno debido al estilo de vida u ocupación y endógeno por la formación de compuestos N-nitrosos dentro del organismo (Laval *et al*, 1990).

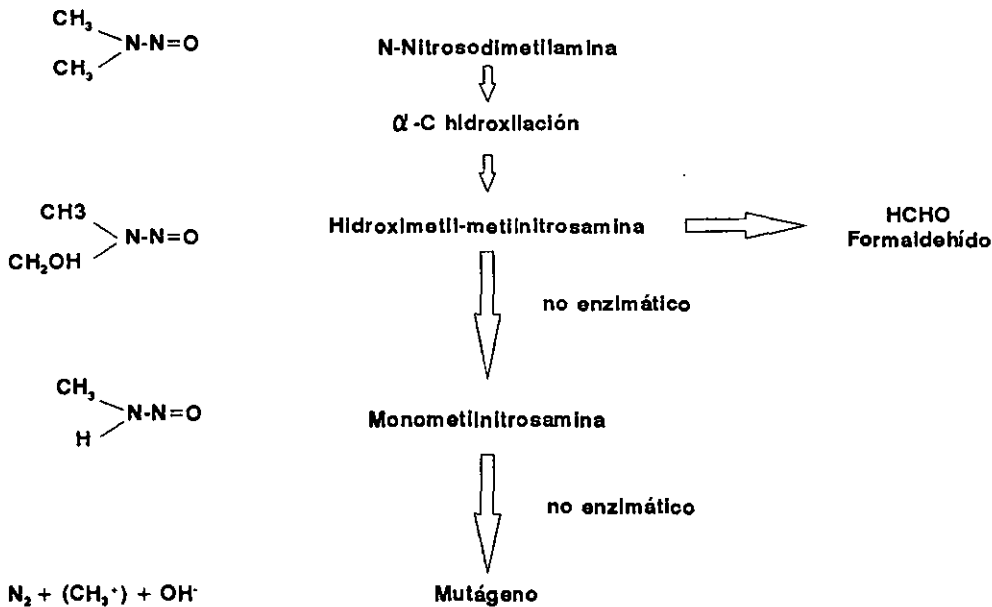


Figura 8. Biotransformación de la N-Nitrosodimetilamina (DMN) (Margison y O'connor, 1979).

OBJETIVOS

1. Evaluar la genotoxicidad de dos plantas medicinales: *Plantago major* (llantén) y *Thevetia thevetioides* (huesito de fraile) en células somáticas de las alas de *Drosophila melanogaster*.
2. Determinar si *Plantago major* y *Thevetia thevetioides* tienen potencial antimutagénico sobre la genotoxicidad de la N-Nitrosodimetilamina (DMN) en *Drosophila melanogaster*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Compuestos utilizados:

La N-Nitrosodimetilamina, $(\text{CH}_3)_2\text{-NNO}$ (DMN), se obtuvo de Sigma [CAS. 62-75-9]. La concentración de la DMN se seleccionó con base en su potencial mutagénico y recombinogénico en *Drosophila*, en la cual se ha establecido que a 10 mM se incrementa la frecuencia de mutación y recombinación de manera significativa (Muñoz, 1994; Ordaz, 1998). Como testigo negativo se utilizó una solución de sacarosa al 5 %. Tanto las semillas de *Thevetia thevetioides*, como la planta completa de *Plantago major*, fueron compradas en el Mercado de Sonora de la Ciudad de México; ambas fueron determinadas en el Herbario de la Facultad de Ciencias de la UNAM.

Las cantidades utilizadas de cada planta y la forma de administración fueron determinadas en base a los reportes de uso tradicional, según diversos autores (Del Amo, 1980; Duke, 1985; García, 1991).

Preparación de las infusiones:

Para *Plantago major*, se pesaron 15 g de la planta completa fresca y se pusieron a hervir en 250 ml de agua destilada durante 10 min.

Para *Thevetia thevetioides*, se pesó 1 g de semilla por cada 50 ml de agua destilada y esto se hirvió durante 10 min.

De cada infusión obtenida, se procedió a hacer dos diluciones: al 25 y al 50 %.

OBJETIVOS

1. Evaluar la genotoxicidad de dos plantas medicinales: *Plantago major* (llantén) y *Thevetia thevetioides* (huesito de fraile) en células somáticas de las alas de *Drosophila melanogaster*.
2. Determinar si *Plantago major* y *Thevetia thevetioides* tienen potencial antimutagénico sobre la genotoxicidad de la N-Nitrosodimetilamina (DMN) en *Drosophila melanogaster*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Compuestos utilizados:

La N-Nitrosodimetilamina, $(\text{CH}_3)_2\text{-NNO}$ (DMN), se obtuvo de Sigma [CAS. 62-75-9]. La concentración de la DMN se seleccionó con base en su potencial mutagénico y recombinogénico en *Drosophila*, en la cual se ha establecido que a 10 mM se incrementa la frecuencia de mutación y recombinación de manera significativa (Muñoz, 1994; Ordaz, 1998). Como testigo negativo se utilizó una solución de sacarosa al 5 %. Tanto las semillas de *Thevetia thevetioides*, como la planta completa de *Plantago major*, fueron compradas en el Mercado de Sonora de la Ciudad de México; ambas fueron determinadas en el Herbario de la Facultad de Ciencias de la UNAM.

Las cantidades utilizadas de cada planta y la forma de administración fueron determinadas en base a los reportes de uso tradicional, según diversos autores (Del Amo, 1980; Duke, 1985; García, 1991).

Preparación de las infusiones:

Para *Plantago major*, se pesaron 15 g de la planta completa fresca y se pusieron a hervir en 250 ml de agua destilada durante 10 min.

Para *Thevetia thevetioides*, se pesó 1 g de semilla por cada 50 ml de agua destilada y esto se hirvió durante 10 min.

De cada infusión obtenida, se procedió a hacer dos diluciones: al 25 y al 50 %.

Líneas de *Drosophila*

Se utilizaron dos líneas de *Drosophila melanogaster* para la cruce estándar: hembras vírgenes *flr³/TM3, Ser* y machos *mwh/mwh*. De esta cruce se obtuvieron larvas transheterocigas para los marcadores de los tricomas (+ *flr³/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* (fig. 9).

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 nipagín (0.26 %) (Ramos *et al.*, 1993).

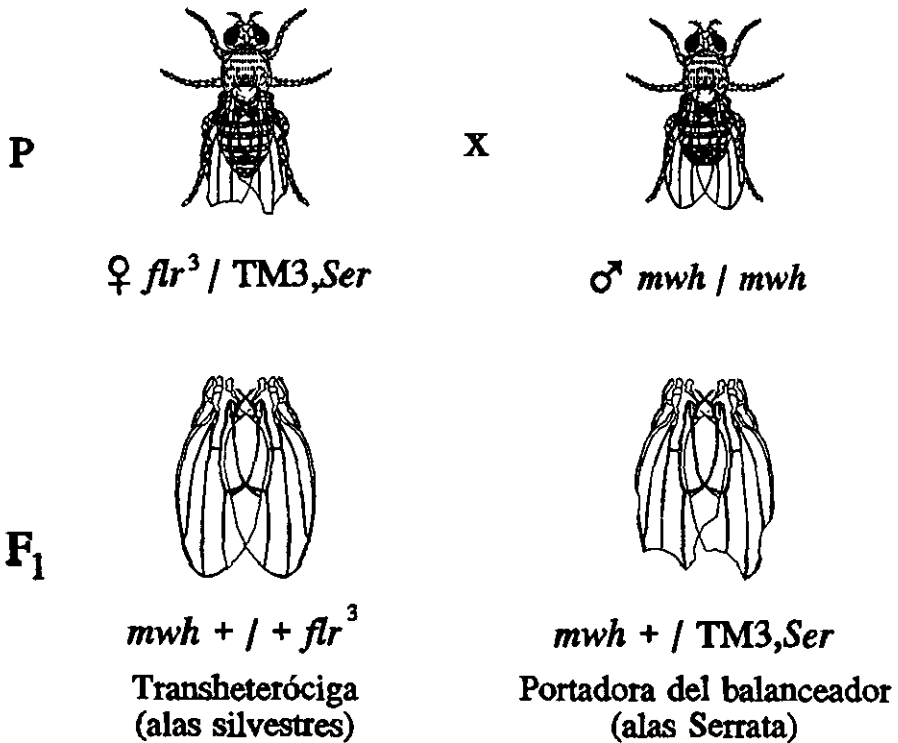


Figura 9. Cruza progenitora para la SMART y fenotipos de las moscas que se obtienen en la F₁ (Tomado de Maldonado, 1994).

Tratamientos

Debido a que en la SMART existe cierta correlación entre el tiempo de inducción y la frecuencia y 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).

Protocolo 72 X 48 h (fig. 10)

Para evaluar la genotoxicidad de las plantas se utilizaron larvas de 72 ± 4 h de edad, las cuales se recuperaron del medio de cultivo por el método de Nöthinger (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. Enseguida las larvas se colocaron por grupos de alrededor de 100 organismos cada uno en tubos homeopáticos que contenían 1 g de medio instantáneo para *Drosophila* (Carolina Biological Supply) y 5 ml de la solución experimental o agua destilada (testigo negativo). En estos tubos se dejó que los organismos completaran su desarrollo para una exposición total de 48 h.

Protocolo 72 X 6 X 48 h (fig. 10)

Debido al uso popular que tienen estas plantas para tratar el cáncer, se procedió a realizar experimentos para determinar alguna posible interacción entre las infusiones de las plantas y el agente alquilante N-nitrosodimetilamina (DMN).

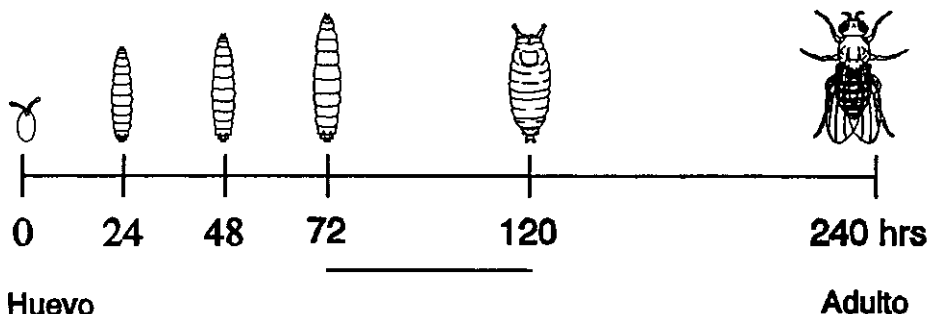
Larvas de 72 ± 4 h de edad se expusieron durante 6 h a la DMN [10 mM], colocándolas en tubos homeopáticos que tenían un extremo cubierto por una gasa de nylon y el otro con un tapón de poliuretano, los cuales se pusieron en contacto con el mutágeno de referencia. Después las larvas se enjuagaron en agua corriente y se transfirieron a tubos que contenían 4 ml de medio de cultivo y 1 ml de la solución experimental (0, 25, 50 o 100 % de infusión), en los que permanecieron hasta completar su desarrollo (48 h de tratamiento), de esta manera la exposición total fue de 6 X 48 h. Cabe aclarar que para cada experimento se realizaron al menos dos repeticiones.

Fijación y elaboración de preparaciones

Las moscas adultas que emergieron de los tratamientos fueron sacrificadas por exceso de anestesia (sobreeterización), y separadas de acuerdo a su fenotipo: libres de inversión (alas

a) PROTOCOLO PARA GENOTOXICIDAD: 72 X 48 h.

- Larvas de 72 +/- 4 h de edad heterocigas para marcadores fenotipicos del ala, expuestas a los compuestos de prueba.



b) PROTOCOLO PARA INTERACCION: 72 X 6 X 48 h.

- Larvas heterocigas de 72 +/- 4 horas de edad expuestas a DMN durante 6 h. Posteriormente se enjuagan y se exponen a los compuestos seleccionados

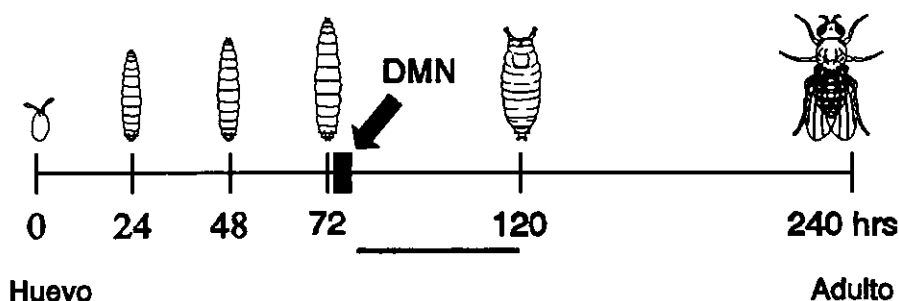


Figura 10. Protocolos utilizados en SMART.

silvestres) y portadoras del cromosoma balanceador (alas Serrata); posteriormente fueron fijadas en alcohol al 70 %. Las alas se disecaron del cuerpo de las moscas con la ayuda de unas pinzas de relojero y se colocaron por pares en portaobjetos con solución Fauré (30 g de goma arábica, 20 ml de glicerol, 50 g de hidrato de cloral y 50 ml de agua) para su análisis posterior al microscopio compuesto a 40 X (Graf *et al*, 1984).

Registro microscópico de las alas

Para el registro de las manchas se tomó únicamente la región distal del ala, la cual se subdivide en siete secciones separadas por la venación natural como: a, b, c, c', d, d' y e (fig. 11) (García Bellido y Merriam, 1971 a; Graf *et al*, 1984).

Se registró cada mancha de acuerdo a la sección del ala en la que se encontró, el número de células que la formaban y el tipo de mancha: *mwh*, *flr*³ o gemela. Las manchas se clasificaron según el tamaño en: simples chicas (1 a 2 células), simples grandes (>3 células) o gemelas (si presentaba los dos marcadores mutantes *mwh* y *flr*³ formando parte de la mancha).

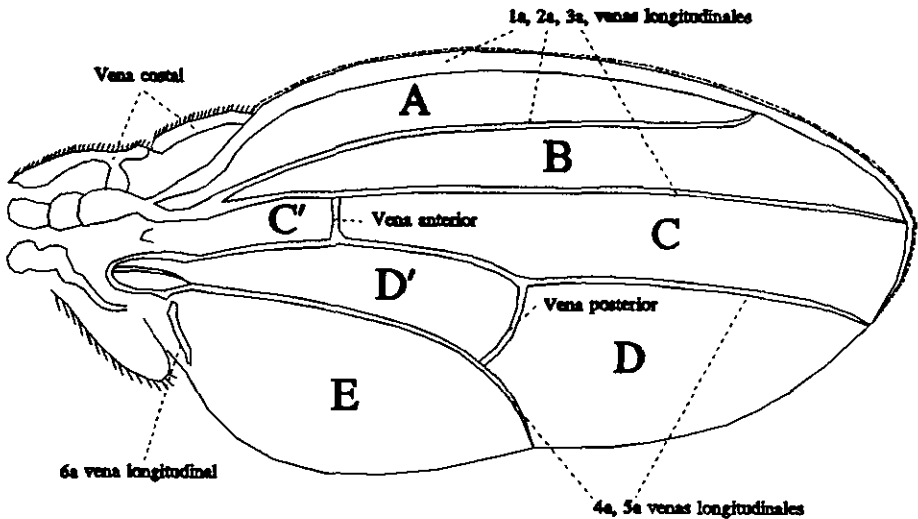


Figura 11. Zonas de registro de manchas en el ala (Tomado de Maldonado, 1994).

Criterios de lectura

Se consideró que dos manchas fueron originadas por procesos independientes si se encontraban separadas por 3 o más hileras de tricomas de tipo silvestre (Graf *et al*, 1984).

Análisis estadístico

El procesamiento de los datos y el análisis estadístico se realizó empleando el programa de cómputo SMART (Frei y Würzler, 1988) basado en la prueba no paramétrica de X^2 y con un nivel de significancia del 5 %. 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 Würzler, 1988).

La comparación de las frecuencias obtenidas se basa en la confrontación de dos hipótesis: La hipótesis nula (**H₀**), señala que no hay diferencias entre la frecuencia de mutación de las series testigo y las tratadas. Si en estas últimas, la frecuencia de mutación se incrementa de manera significativa, la **H₀** se rechaza. Por otro lado, la hipótesis alternativa (**H_a**), postula que en las series tratadas hay un incremento estadístico igual a "m" veces la frecuencia basal. Dado que la frecuencia de manchas chicas y de manchas totales, es mucho mayor que la frecuencia de manchas simples grandes y la de manchas gemelas, se utiliza m=2 para las primeras y m=5 para las segundas. Si se acepta la **H₀** y se rechaza la **H_a** el resultado es negativo (-), por el contrario, si se rechaza la **H₀** y se acepta la **H_a**, el resultado es positivo (+); por otro lado, si las dos hipótesis se rechazan, el resultado se considera débil positivo (d+), y si ambas se aceptan, el resultado es indeterminado (i) (tabla I).

Por otra parte, se utilizó la prueba no paramétrica de comparaciones múltiples (**Kruskal-Wallis**) para la sobredispersión en el número de manchas por mosca $\alpha=0.05$. La prueba de Kruskal-Wallis aplicada a la dispersión poblacional contribuye a la toma de decisiones sobre la genotoxicidad de los compuestos evaluados en SMART (Ramos *et al*, 1996; Zar, 1983).

H_0 \ H_A	Se acepta H_A	Se rechaza H_A
Se acepta H_0	Indeterminado (i)	Negativo (-)
Se rechaza H_0	Positivo (+)	Débil positivo (d+)

Tabla I. Resultados posibles en SMART. H_0 = hipótesis nula, H_A = hipótesis alternativa (Según Frel y Würigler, 1988).

RESULTADOS

Debido a que se utilizaron dos protocolos de experimentación, los resultados se muestran por separado, considerando en primer lugar el protocolo de 72 X 48 h (genotoxicidad de las plantas) y en segundo, el de 72 X 6 X 48 h (potencial antimutagénico), tanto para *P. major*, como para *T. thevetioides*.

En el análisis gráfico se muestra primero la frecuencia de manchas por mosca, después el número de células por mancha y por último, la distribución de manchas por mosca.

Plantago major

Se expusieron larvas de 72 h de edad a las diferentes concentraciones de la infusión durante 48 h (protocolo 72 X 48 h). Se encontró que la frecuencia de manchas inducida por *P. major* fue semejante a la encontrada en el testigo negativo. Aunque en la dilución al 50 % se observa un ligero incremento en la frecuencia de manchas chicas y manchas totales, el análisis estadístico no mostró diferencias significativas entre éstas y las encontradas en el lote testigo (tabla II y fig. 12).

El comportamiento fue similar al analizar el número de células por mancha y el número de

manchas por mosca (figs. 13 y 14 respectivamente), no se encontraron diferencias significativas entre los lotes.

Cuando se trataron larvas de 72 h de edad con DMN durante 6 h y después con las diferentes concentraciones de la infusión (protocolo 72 X 6 X 48 h), se observó que la frecuencia de manchas es semejante entre la serie control y las experimentales para todos los tipos de manchas (tabla III y fig. 15). El número de células por mancha (fig. 16), así como la distribución de manchas por mosca (fig. 17) es similar entre el lote testigo y los lotes experimentales.

Thevetia thevetioides

La tabla IV y la fig. 18 muestran la frecuencia de manchas por ala obtenidas en moscas tratadas con *T. thevetioides* (protocolo 72 X 48 h). Las diferencias encontradas entre la serie del testigo negativo y las series experimentales no son significativas para los diferentes tipos de mancha, aunque para la infusión al 100 % en manchas chicas se obtuvo un resultado indeterminado.

No se encontraron diferencias significativas en el número de células por mancha (fig. 19) ni en la distribución de manchas por mosca (fig. 20), entre el lote testigo y los lotes experimentales.

La adición de la solución de *Thevetia* no modificó los efectos provocados por la DMN en las moscas tratadas (protocolo 72 X 6 X 48 h), como se observa en la frecuencia de manchas obtenidas (tabla V y fig. 21). También se encontraron valores semejantes para los diferentes tamaños de mancha entre el lote testigo y los lotes experimentales (fig. 22) así como en la distribución de manchas por mosca. Aunque los carriles de las series experimentales se muestran ligeramente más dispersos que el testigo, las diferencias no fueron significativas (fig. 23).

Los resultados también fueron sometidos a la prueba de Kruskal Wallis para comparar la dispersión poblacional de las series experimentales contra la serie testigo; sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre ellas.

Tabla II. Frecuencia de manchas inducidas por *Plantago major* en células de las alas de *Drosophila melanogaster*. Exposición: 72 X 48 h.

Infusión [%]	Número de alas analizadas	Manchas Simples Pequeñas (1-2 cel.) m=2		Manchas Simples Grandes (>2 cel.) m=5		Manchas Gemelas (ambos fenotipos) m=5		Manchas Totales m=2		Clones con células mwh	Tamaño Promedio de clase clonal	Frecuencia de formación de clones X 10 ⁶	
		Frec.	No.	Frec.	No.	Frec.	No.	Frec.	No.			Observada	Testigo corregido
Testigo*	120	0.37	44	0.05	6	0.02	2	0.43	52	52	1.69	1.8	
25	120	0.30	36	0.05	6	0.00	0	0.35	42	42	1.95	1.4	-0.3
50	120	0.48	58	0.03	4	0.04	5	0.56	67	66	1.73	2.3	0.5
100	120	0.30	36	0.03	3	0.00	0	0.32	39	39	1.49	1.3	-0.4

*Testigo negativo sacarosa al 5 %

+ = positivo; - = negativo; d* = débil positivo; i = indeterminado; m = factor de multiplicación.

Niveles de probabilidad: $\alpha = 0.05$.

Prueba estadística de una cola.

Figura 12. Frecuencia de manchas por ala inducida por *Plantago major* en *Drosophila melanogaster*. Exposición: 72 X 48 h.

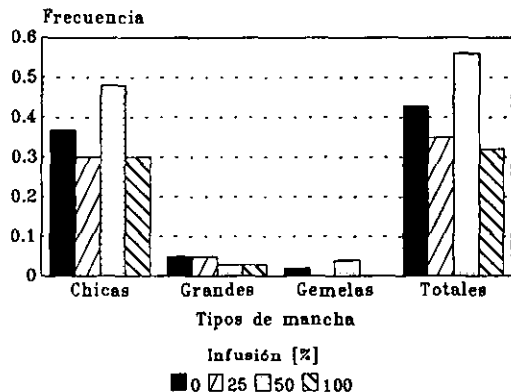


Figura 13. Número de células por mancha en moscas tratadas con *Plantago major*. Exposición: 72 X 48 h.

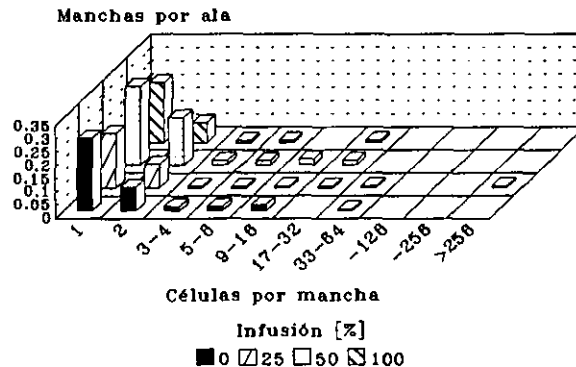


Figura 14. Distribución de manchas en moscas tratadas con *Plantago major*. Exposición: 72 X 48 h.

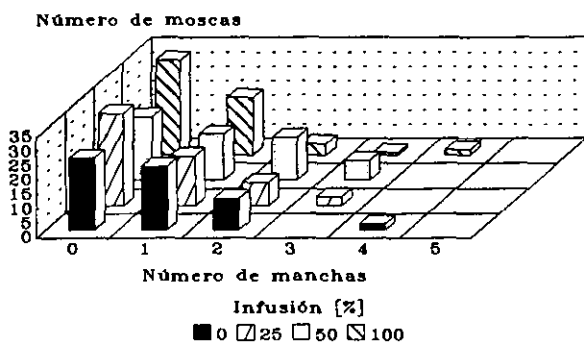


Tabla III. Frecuencia de manchas inducidas por DMN + *Plantago major* en células de las alas de *Drosophila melanogaster*. Exposición: 72 X 6 X 48 h.

Influencia [%]	Número de alas analizadas	Manchas Simples Pequeñas (1-2 cel.) m=2		Manchas Simples Grandes (>2 cel.) m=5		Manchas Gemelas (ambos fenotipos) m=5		Manchas Totales m=2		Clones con células mwh	Tamaño Promedio de clase clonal	Frecuencia de formación de clones X 10 ⁶	
		Frec.	No.	Frec.	No.	Frec.	No.	Frec.	No.			Observada	Testigo corregido
Testigo*	124	4.47	554	5.82	722	0.90	111	11.19	1387	1194	3.03	39.5	
25	126	4.87	614	6.98	880	0.94	118	12.79	1612	1332	3.01	43.4	3.9
50	130	4.05	526	7.04	915	0.81	105	11.89	1546	1307	3.27	41.2	1.7
100	126	4.74	597	6.02	759	0.83	105	11.60	1461	1212	3.01	39.5	0.0

*Testigo positivo DMN (10 mM) + sacarosa al 5%.

+ = positivo; - = negativo; d = débil positivo; i = indeterminado; m = factor de multiplicación.

Niveles de probabilidad: $\alpha = 0.05$.

Prueba estadística de una cola.

Figura 15. Frecuencia de manchas por ala inducida por DMN + *Plantago major* en *Drosophila melanogaster*. Exposición: 72 X 6 X 48 h.

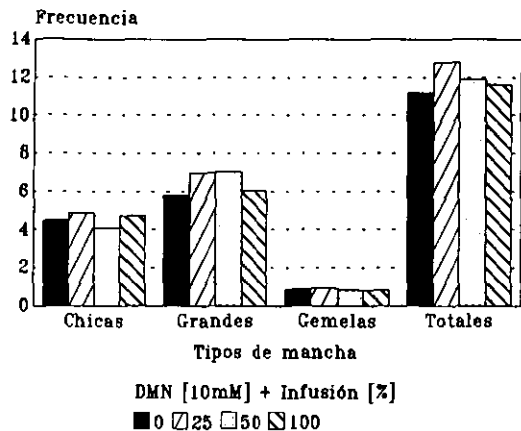


Figura 16. Número de células por mancha en moscas tratadas con DMN + *Plantago major*. Exposición: 72 X 6 X 48 h.

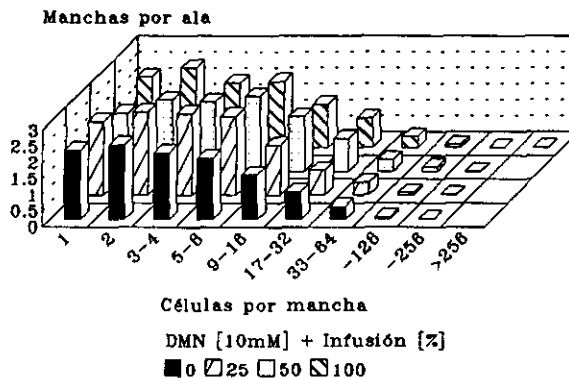


Figura 17. Distribución de manchas en moscas tratadas con DMN + *Plantago major*. Exposición: 72 X 6 X 48 h.

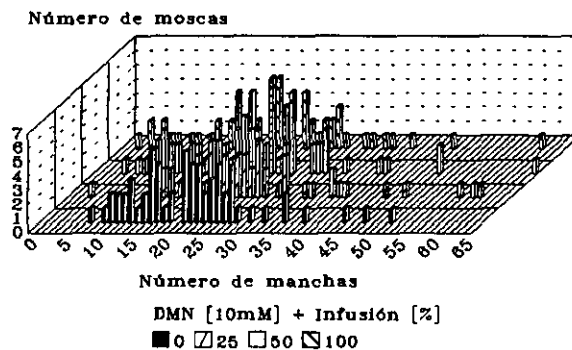


Tabla IV. Frecuencia de manchas inducidas por *Thevetia thevetioides* en células de las alas de *Drosophila melanogaster*. Exposición: 72 X 48 h.

Infusión [%]	Número de alas analizadas	Manchas Simples Pequeñas (1-2 cel.) m=2		Manchas Simples Grandes (>2 cel.) m=5		Manchas Gemelas (ambos fenotipos) m=5		Manchas Totales m=2		Clones con células mwh	Tamaño Promedio de clase clonal	Frecuencia de formación de clones X 10 ⁶	
		Frec.	No.	Frec.	No.	Frec.	No.	Frec.	No.			Observada	Testigo corregido
Testigo*	120	0.32	39	0.05	6	0.05	6	0.43	51	51	1.96	1.7	
25	120	0.34	41	0.00	0	0.03	3	0.37	44	44	1.50	1.5	-0.2
50	120	0.31	37	0.07	8	0.03	3	0.40	48	48	1.79	1.6	-0.1
100	120	0.47	56	0.04	5	0.02	2	0.52	63	63	1.70	2.2	0.4

*Testigo negativo sacarosa al 5 %

+ = positivo; - = negativo; d* = débil positivo; i = indeterminado; m = factor de multiplicación.

Niveles de probabilidad: $\alpha = 0.05$.

Prueba estadística de una cola.

Figura 18. Frecuencia de manchas por ala inducida por *Thevetia thevetioides* en *Drosophila melanogaster*. Exposición: 72 X 48 h.

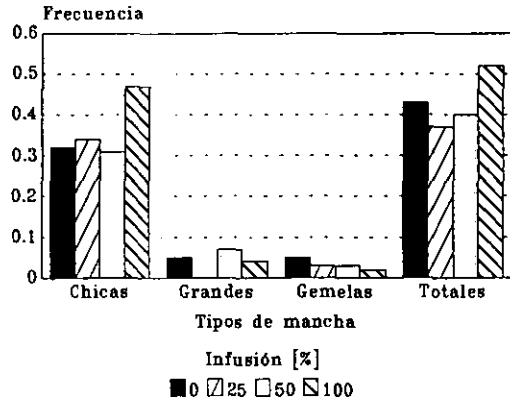


Figura 19. Número de células por mancha en moscas tratadas con *Thevetia thevetioides*. Exposición: 72 X 48 h.

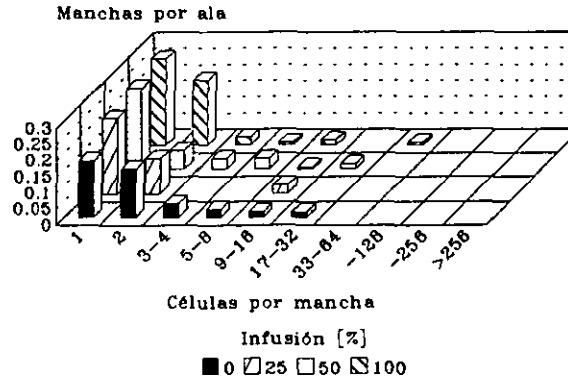


Figura 20. Distribución de manchas en moscas tratadas con *Thevetia thevetioides*. Exposición: 72 X 48 h.

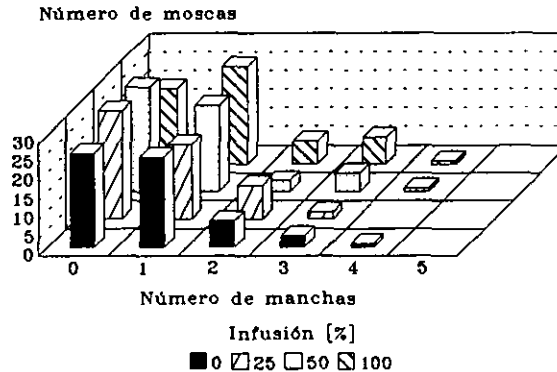


Tabla V. Frecuencia de manchas inducidas por DMN + *Thevetia thevetioides* en células de las alas de *Drosophila melanogaster*. Exposición: 72 X 6 X 48 h.

Infusión [%]	Número de alas analizadas	Manchas Simples Pequeñas (1-2 cel.) m=2		Manchas Simples Grandes (>2 cel.) m=5		Manchas Gemelas (ambos fenotipos) m=5		Manchas Totales m=2		Clones con células <i>mwh</i>	Tamaño Promedio de clase clonal	Frecuencia de formación de clones X 10 ⁴	
		Frec.	No.	Frec.	No.	Frec.	No.	Frec.	No.			Observada	Testigo corregido
Testigo*	66	7.95	525	9.41	621	1.39	92	18.76	1238	1069	2.82	66.4	
25	80	8.00	640	9.59	767	1.77	1424*	19.36	1549	1316	2.78	67.5	1.0
50	74	5.31	393	10.42	771	1.68	124	17.41	1288	1069	3.16	59.3	-7.2
100	58	7.53	437	10.00	580	1.88	1094*	19.41	1126	913	2.82	64.6	-1.9

*Testigo positivo DMN [10 mM]+ sacarosa al 5%.

+ = positivo; - = negativo; d* = débil positivo; i = indeterminado; m = factor de multiplicación.

Niveles de probabilidad: $\alpha = 0.05$.

Prueba estadística de una cola.

Figura 21. Frecuencia de manchas por ala inducidas por DMN + *Thevetia thevetioides* en *Drosophila melanogaster*. Exposición: 72 X 6 X 48 h.

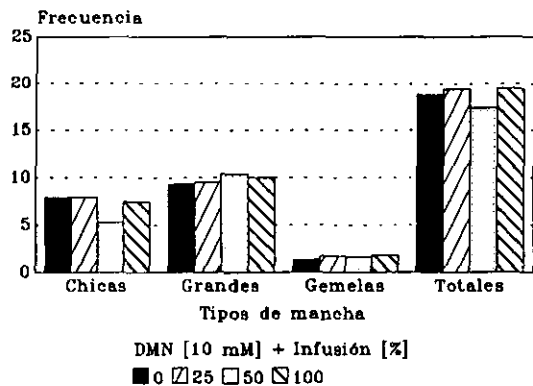


Figura 22. Número de células por mancha en moscas tratadas con DMN + *Thevetia thevetioides*. Exposición: 72 X 6 X 48 h.

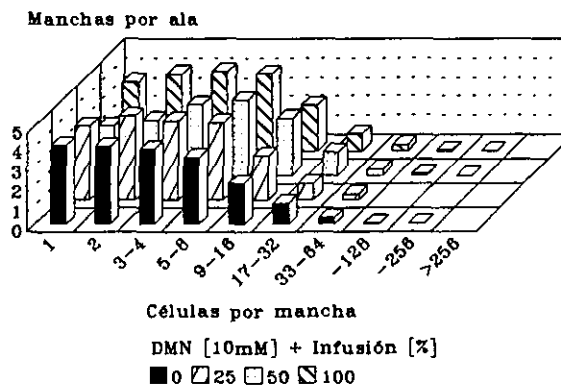
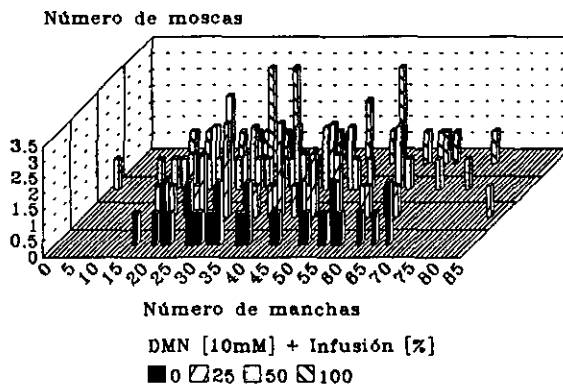


Figura 23. Distribución de manchas en moscas tratadas con DMN + *Thevetia thevetioides*. Exposición: 72 X 6 X 48 h.



DISCUSIÓN

Se estima que cerca del 80 % de los 5,200 millones de personas en el mundo, viven en países poco desarrollados. La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que cerca del 80 % de estas personas depende de la medicina tradicional para sus necesidades básicas de salud.

Puesto que las plantas medicinales son la “columna vertebral” de la medicina tradicional, esto significa que cerca de 3,300 millones de personas en los países menos desarrollados las utilizan regularmente, principalmente aquellas poblaciones que no tienen la capacidad de pagar el costo de la medicina occidental, por esta razón es necesario estudiar las plantas para tener mayor seguridad en su uso, su eficiencia y para desarrollar productos galénicos estandarizados que sean estables (Farnsworth, 1994).

En este trabajo se utilizó a la *Drosophila* para estudiar la genotoxicidad de *Plantago major* y *Thevetia thevetioides*, dos plantas ampliamente utilizadas en la medicina tradicional, no sólo en México, sino también en varias partes del mundo. Sin embargo se conoce poco de estas plantas, siendo este tipo de estudios una parte fundamental en el conocimiento de las plantas medicinales y sobre todo, en la validación de la seguridad en su uso.

Dado su posible valor terapéutico, es necesario utilizar bioensayos que permitan conocer los efectos de estas plantas en el ser humano. El propósito de este trabajo es conocer el efecto de cada planta en *Drosophila*, por lo que se procedió a estudiar su potencial genotóxico (protocolo 72 X 48 h) y antimutagénico (protocolo 72 X 6 X 48 h).

Las plantas fueron administradas según las recomendaciones de uso propuestas en varios libros de plantas medicinales (Del Amo, 1980; Duke, 1985; García, 1991) que describen, cómo las utiliza la población en general. Los tratamientos se dieron utilizando infusiones, ya que estas plantas son usadas de esta forma y por administración oral (Lozoya y Velázquez, 1988). Además, se prepararon dos diluciones (25 y 50 %) con el fin de estudiar varias concentraciones de la infusión, ya que en ocasiones, a dosis o concentraciones menores, aparecen efectos producidos por los compuestos que las plantas poseen, y en concentraciones más altas, pueden resultar tóxicos para los bioensayos.

El interés por estudiar estas plantas nació cuando se observó que se utilizan en muchas partes del país y se les dan usos medicinales muy diversos, aunque lo que más llamó la atención fue que se utilizan para tratar el cáncer (Del Amo, 1980; Duke, 1985; García, 1991). Dado que se

utilizan para tratar varios tipos de enfermedades, aplicando las plantas en diferentes formas, debe existir cierta confianza en su uso ya que se tiene una cultura tradicional que se ha transmitido por numerosas generaciones, durante las cuales se han ido seleccionando las plantas útiles e inocuas mediante ensayo y error distinguiendo éstas de las plantas peligrosas.

Los resultados obtenidos muestran que *Plantago major* y *Thevetia thevetioides* en las condiciones probadas no son genotóxicas en *Drosophila melanogaster*. No se observó incremento en la frecuencia de mutaciones de las series experimentales, con respecto a la del testigo; esto indica que los componentes contenidos en las infusiones y las diluciones no fueron capaces de promover o inducir alteraciones en las alas de las moscas.

En ambas infusiones se induce una respuesta similar. Cuando se analiza el número de células por mancha en las moscas, éstas muestran valores semejantes a las moscas del lote testigo, este análisis permite estimar el momento en el cual se indujo la alteración durante el desarrollo de la mosca; cuando se induce daño en etapas tempranas del desarrollo, generalmente se recobran manchas grandes (> 3 células), esto es porque hay un mayor número de divisiones celulares posteriores a la inducción de la alteración; en cambio, cuando la alteración ocurre en etapas finales, en las últimas 24 h después de la formación del pupario, las manchas recobradas son chicas (1-2 células). En ambas infusiones las manchas chicas son las que se encuentran en mayor proporción, tanto en el lote testigo, como en los lotes experimentales. Esta distribución de células por mancha es la esperada para la frecuencia de mutación espontánea, en la que es común encontrar manchas chicas y relativamente raro encontrar manchas grandes. Se observa que la distribución de los diferentes tamaños de manchas en los lotes experimentales es semejante a la distribución en el lote testigo, lo que indica que no hubo efecto del tratamiento.

En relación a la susceptibilidad de las larvas tratadas con *P. major* y *T. thevetioides* se encontró que el número de manchas por mosca es similar en el lote testigo y en la serie experimental. Se conoce que en una población normal (sin tratamiento) el mayor número de individuos no presenta manchas, le siguen en cantidad los que presentan una sola mancha, luego los que presentan dos manchas y así sucesivamente, siendo raro encontrar individuos con más de 4-5 manchas. Los resultados demuestran que en ambas infusiones probadas las moscas de las series experimentales presentan en su mayoría pocas manchas (1-2) y sólo algunas presentan más de 3,

esta distribución coincide con la mostrada por la serie testigo, lo cual indica que los tratamientos con *P. major* y *T. thevetioides* no promovieron la generación de más manchas en los organismos. Sin embargo se ha reportado que varios extractos o sustancias obtenidas de estas plantas muestran actividad citotóxica o genotóxica (Ponce *et al*, 1994; Argueta *et al*, 1994; Suffness *et al*, 1988; Gaitonde y Joglekar, 1977).

Plantago major posee algunos compuestos que por sí solos son tóxicos. Este es el caso de los glucósidos como los flavonoides presentes principalmente en las hojas de la planta, los cuales mostraron ser mutagénicos y carcinogénicos en diversos sistemas de prueba (Nagao *et al*, 1981; Elliger *et al*, 1984; Pamucku *et al*, 1980; Erturk *et al*, 1983; Graf *et al*, 1994). Otro componente tóxico es el ácido erúrico el cual se ha encontrado en una concentración de 3.45 % (Guil *et al*, 1997). A pesar de la presencia de estas sustancias en la planta ésta no indujo alteraciones visibles en las alas de *Drosophila*. Cabe aclarar que en los reportes de toxicidad de los flavonoides como la quercetina y la miricetina, estos compuestos se utilizaron purificados (Jurado *et al*, 1991; Mitchell *et al*, 1993; Graf *et al*, 1994; Duthie *et al*, 1997) a diferencia de la infusión obtenida de la planta completa utilizada en este ensayo. Hecha esta observación, se podría pensar que la aparente falta de respuesta encontrada en este trabajo pudo ser debida a que posiblemente los compuestos antes mencionados se encontraban en la infusión a tan bajas concentraciones, que no pudieron provocar daño en las moscas. Otro factor importante a considerar es la solubilidad de estos compuestos; la quercetina es prácticamente insoluble en agua y la miricetina es ligeramente soluble en agua sólo cuando ésta se encuentra en ebullición (Index Merck, 1989), de tal forma que aunque hubieran estado presentes en la infusión, no pudieron ser asimilados por las larvas; quizá fueron destruidos, inactivados o eliminados durante la preparación de la infusión considerando que la temperatura es un factor determinante de las propiedades fisicoquímicas de los compuestos. Otra explicación alternativa sería que, debido a que la infusión es una mezcla compleja de compuestos, ahí se estaría dando posiblemente una serie de interacciones antagónicas que pudieran no permitir a los compuestos actuar como lo harían si estuvieran solos. Este es uno de los problemas principales cuando se trabaja con mezclas complejas en los sistemas de prueba, ya que es difícil determinar la actividad de cada uno de los compuestos participantes en la mezcla. Aunque también hay que

considerar que la mosca tiene sistemas de almacenamiento, excreción, desintoxicación y reparación que bien pudieron haber actuado para evitar o corregir las posibles alteraciones inducidas.

Thevetia thevetioides se distingue por la presencia del glucósido thevetina, el cual es tóxico y actúa como una sustancia cardioactiva con acción similar a los compuestos digitálicos (Martínez, 1959). Dado que en esta especie se ha determinado la presencia de la thevetina y además es utilizada para tratar algunas enfermedades, resultó interesante estudiarla porque por una parte ofrecía una posible actividad benéfica e importante para la salud, pero a la vez, podría implicar peligro debido a la presencia de la thevetina. Por lo tanto, se pensó que podría tener actividad positiva frente a la DMN, aunque existía la posibilidad de que resultara tóxica para las moscas. Los resultados demostraron que *T. thevetioides* no es genotóxica, lo cual puede tener varias explicaciones: 1) Aunque está comprobado experimentalmente que las semillas de *Thevetia* contienen thevetina, lo que no se demostró fue que la infusión obtenida de las semillas todavía poseyera este compuesto. Es decir, puede ser que al realizar el cocimiento de las semillas la thevetina haya sido destruida o inactivada y de esta forma no se indujera el efecto genotóxico en las moscas. Esta observación es de gran importancia puesto que en todos los reportes de intentos de suicidio, de suicidios consumados en seres humanos y de envenenamiento en animales, la ingestión de las semillas ha sido en su forma “cruda” o natural, contrastando con el hecho de que las recomendaciones de uso de las semillas de *Thevetia* para tratar diversas enfermedades, en general indican el uso de infusiones. 2) Este hecho se encuentra apoyado por lo siguiente: en la naturaleza hay una variedad de organismos que muestran resistencia a la ingesta de glucósidos cardiacos. Entre ellos destaca la mariposa monarca (*Danaus plexippus*), la cual muestra resistencia a los glucósidos cardiacos, los cuales utiliza como defensa a la depredación (Holzinger *et al.*, 1992). Por otro lado, *Drosophila* es uno de los organismos que muestra enzimas sensibles a los glucósidos cardiacos (Holzinger *et al.*, 1992). Con estos antecedentes se esperaba que las soluciones probadas, hubieran resultado tóxicas en *Drosophila*. Sin embargo, el desarrollo de las moscas fue normal y no se detectaron alteraciones macroscópicas visibles ni efecto en la sobrevivencia esperada. Esto sugiere algún mecanismo de inactivación o eliminación de la thevetina, ya que no se detectaron los efectos esperados de ella

en *Drosophila*.

Para confirmar y ampliar los resultados de esta investigación sería interesante ensayar la actividad individual de los compuestos importantes de cada planta en *Drosophila*, por ejemplo los flavonoides para *P. major* y la thevetina para *T. thevetioides*.

También sería importante realizar estudios químicos para evidenciar la presencia de estos compuestos, inicialmente en las plantas en estado fresco y posteriormente en las infusiones obtenidas de estas plantas. Esto permitiría darle seguimiento a estas sustancias y posiblemente asignarles actividades que permanecieran inalteradas aún después del proceso de obtención de las infusiones.

Por otra parte, el segundo objetivo que se planteó fue evaluar el potencial antimutagénico del llantén y *T. thevetioides*. Esto se hizo porque, como ya se mencionó, se utilizan en el tratamiento del cáncer. Esta enfermedad, aunque es de naturaleza multifactorial, tiene un claro fondo mutagénico, es decir se ha visto que la aparición de un cáncer frecuentemente se asocia con una alteración de origen mutacional (Alberts *et al*, 1994).

Para evaluar el potencial antimutagénico de las infusiones de *P. major* y *T. thevetioides* se utilizó como mutágeno de referencia a la N-Nitrosodimetilamina (DMN). Este compuesto se eligió porque muestra efectos claramente positivos en los diferentes sistemas de prueba y se conoce gran parte de su actividad genotóxica y los mecanismos por los que es biotransformado en los seres vivos. Por lo tanto es un compuesto útil para elaborar pruebas de sinergismo, antagonismo y como mutágeno en pruebas de antimutagenicidad (Maldonado, 1997).

La concentración que se utilizó fue de 10 mM debido a que a esta concentración se inducen en *Drosophila* todos los tipos de manchas en el ensayo SMART de las alas y sirve como testigo positivo para comparar la actividad de los compuestos que se están probando.

En *P. major* se observa que la frecuencia de manchas encontradas en los lotes experimentales, es semejante a la frecuencia de manchas del lote testigo; esto indica que la administración de la planta posterior al tratamiento agudo con la DMN, no induce una disminución en la frecuencia de manchas por parte de la planta, mientras para *T. thevetioides* se encontró una respuesta similar, excepto en la infusión al 50% para manchas chicas, donde se observa una ligera disminución en la frecuencia de manchas, aunque esta diferencia no resultó estadísticamente

significativa. Con respecto al análisis de células por mancha *P. major* no modificó los efectos de la DMN lo que indica que las soluciones probadas no interfirieron con la actividad del mutágeno. Una respuesta similar se encontró para *T. thevetioides*. Probablemente las infusiones carecían de los compuestos activos y no hubo elemento alguno que pudiera modificar los efectos de la DMN.

Por último al analizar el número de manchas por mosca en *P. major*, la mayor parte de la población presenta de 10 a 30 manchas por mosca; pocas moscas presentan menos de 10 manchas y también las que presentan más de 30 manchas están en menor cantidad, tanto en el testigo positivo como en los experimentales. En el caso de *T. thevetioides* se observa que la distribución de manchas por mosca en los diferentes carriles presenta ligeras diferencias, aunque estas no son estadísticamente significativas. Resulta evidente que el tratamiento con las plantas no evitó los efectos de la DMN en las moscas. Si hubiera habido protección por parte de las infusiones, en los lotes experimentales habría mayor número de moscas con menor número de manchas, es decir, el tratamiento con las plantas modificaría a la población haciendo organismos más resistentes (menos susceptibles) al mutágeno o reduciría los efectos de éste en las moscas, pero no sucedió de esta manera a pesar de que se ha reportado que varios compuestos presentes en *P. major* y *T. thevetioides* muestran actividad positiva contra diversos tipos de tumores (Karpilovskaia *et al*, 1989; Murai *et al*, 1995; Zhang *et al*, 1994). Nuevamente se hace la aclaración de que en esos ensayos se utilizaron compuestos aislados, además de que los aspectos genéticos terminales de los bioensayos son diferentes. Dado que en este trabajo no se encontró actividad protectora por parte de las plantas, se considera que las soluciones probadas no contenían los componentes activos o que estos se inactivaron durante el proceso de preparación de la infusión. Para tener mayor información sobre estas plantas sería interesante utilizar otros dos protocolos existentes. El primero consiste en administrar la infusión y posteriormente el mutágeno para saber si se tiene una actividad protectora o de prevención del daño. El segundo protocolo consiste en administrar simultáneamente ambas soluciones (la de la planta y la del mutágeno) para evaluar las posibles interacciones que se generarían al combinarse las moléculas de las diferentes soluciones y determinar los efectos producidos por esas interacciones. Se tendría una aportación relevante si se probaran esos compuestos aislados, en *Drosophila*, para determinar su actividad en este sistema y así, comparar esos resultados con los encontrados en

este trabajo.

CONCLUSIONES

1. *Plantago major* y *Thevetia thevetioides* en las condiciones probadas no resultaron genotóxicas en las células de las alas de *Drosophila melanogaster*.
2. Los tratamientos con la infusión de *P. major* o *T. thevetioides* no modificaron la genotoxicidad de la N-Nitrosodimetilamina (DMN) sobre las células somáticas de las alas de *Drosophila*.

SUGERENCIA

Es importante realizar estudios paralelos complementarios (químicos, bioquímicos y físicos) cuando se trabaja con mezclas complejas como las infusiones obtenidas de plantas medicinales y de esta forma elucidar a diferentes niveles la actividad de los metabolitos con importancia farmacológica.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aguilar, A. y Martínez, A. M. (1993) Los herbarios medicinales de México. En: Lozoya X. (Ed.) La investigación científica de la herbolaria medicinal mexicana. Secretaría de Salud, México. Pag. 89-102.

Ahlawat, S.K., Agarwal, A.K. y Wadhwa, S. (1994) Rare poisoning with cerebra thevetia (yellow oleander): a report of three cases. *Trp. Doct.* Jan; 24(1): 37-38.

Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. y Watson, J.D. (1994) Molecular biology of the cell. Garland Publishing Inc. New York. U.S.A. 1294 pp.

Ansford, A.J. y Morris, H. (1981) Fatal oleander poisoning. *Med. J. Aust.* Apr. 4; 1 (7): 360-361.

Argueta, A.V. (1994) Atlas de las plantas de la medicina tradicional mexicana. Instituto Nacional Indigenista. México, D.F. Tomos II y III.

Baars, A.J., Blijleven, G.H., Mohn, G.R., Natarajan, A.T. y Brünner, D.D. (1980) Preliminary studies on the ability of *Drosophila melanogaster* preparations to active mutagens and carcinogens. *Mutation Res.* 72: 257-264.

Basaran, A.A., Yu, T.W., Plewa, M.J. y Anderson, D. (1996) An investigation of some Turkish herbal medicines in *Salmonella typhimurium* and in the COMET assay in human lymphocytes. *Teratog. Carcinog. Mutagen.* 16 (2): 125-138.

Bhattacharya, S.K., Somani, P.N. y Srivastava, P.K. (1976) Cardiac changes in *Thevetia neriifolia* poisoning. *Acta Cardiol.* 31 (2): 169-174.

Bruneton, J. (1995) Pharmacognosy, Phytochemistry, Medicinal Plants. Lavoisier.

Francia, París. 915 pp.

Cabrera, G.L. (1975) *Yerbario mexicano*. Gómez Gómez Hnos. Eds. México. 239 pp.

Crick, F.C.H. y Lawrence, P.A. (1975) Compartments and polyclones in insect development. *Science*, 189: 340-347.

Del Amo, R.S. (1979) *Plantas medicinales del Estado de Veracruz*. Instituto Nacional de Investigaciones Sobre Recursos Bióticos. Veracruz, México. 279 pp.

Delgado, R.A. (1990) Daño genético inducido por mutágenos positivos en células del ala de *Drosophila melanogaster* *Tesis de Licenciatura*, Facultad de Ciencias, UNAM. 75 pp.

Demerec, M. (1965) *Biology of Drosophila*. Hafner Publishing Company. Nueva York, 633 pp.

Doan, D.D., Nguyen, N.H., Doan H.K., Nguyen, T.L., Phan, T.S., Van Dau, N., Grabe, M., Johansson, R. Lindgren, G. y Stjernstrom, N.E. (1992) Studies on the individual and combined diuretic effects of four Vietnamese traditional herbal remedies (*Zea mays*, *Imperata cylindrica*, *Plantago major* and *Orthosiphon stamineus*). *J. Ethnopharmacol.* Jun; 36 (3): 225-231.

Duke., J.A. (1985). *Handbook of Medicinal Herbs*. CRC Press. USA. 667 pp.

Duthie, S.J., Johnson, W. y Dobson, V.L. (1997) The effect of dietary flavonoids on DNA damage (strand breaks and oxidised pyrimidines) and growth in human cells. *Mutat. Res.* 390(1-2):141-51.

Elliger, C.A., Henika, P.R. y MacGregor, J.T. (1984) Mutagenicity of flavones,

chromones and acetophenones in *Salmonella typhimurium*: new structure-activity relationships. *Mutat. Res.*, 135: 77-86.

EMS (Environmental Mutagen Society) (1976) Environmental mutagen hazards. *Science*. 187: 503-514.

Erturk, E., T. Nunoya, J.F. Hatcher, A.M. Pamukcu y G.T. Bryan (1983) Comparison of bracken fern and quercetin carcinogenicity in rats. *Proc. 74th Annu. Mtg. Am. Assoc. Cancer Res.*, 24-53.

Evans, Ch. W. (1991) Farmacognosia. Interamericana. McGraw-Hill. México. 901 pp.

Farnsworth, N.R. (1994) Ethnopharmacology and drug development. In: Ethnobotany and the search for new drugs. 1994. Wiley, Chichester (Ciba Foundation Symposium 185). Pag. 42-59.

Franca, F., Lago, E.L. y Marsden, P.D. (1996) Plants used in the treatment of leishmanial ulcers due to *Leishmania (Viannia) braziliensis* in an endemic area of Bahia, Brazil. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* May; 29 (3): 229-232.

Frei, H. y Würigler, F.E. (1988) Statistical methods to decide whether mutagenicity test data from *Drosophila* assays indicate a positive, negative or inconclusive results. *Mutation Res.* 203: 297-308.

Gaitonde, B.B. y Joglekar, S.N. (1977) Mechanism of neurotoxicity of cardiotonic glycosides. *Br. J. Pharmacol.* Feb; 59 (2): 223-229.

García, R.H. (1991) Plantas curativas mexicanas. Panorama. México. 263 pp.

García, B. A. y Merriam, J.R. (1971a) Parameters of the wing imaginal disc development of *Drosophila melanogaster*. *Develop. Biol.* 24: 61-87

Graf, U., Würgler, F. Katz, A., Frei, H., Juon, H., Hall, C. y Kale, P. (1984) Somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Environ. Mutagen.* 6: 153-188.

Graf, U., Juon, H., Katz, A.J., Frei, H.J. y Würgler, F.E. (1983) A pilot study on a new *Drosophila* spot test. *Mutation Res.* 120: 233-239.

Graf, U., Moraga, A.A., Castro, R. y Díaz, C.E. (1994) Genotoxicity testing of different types of beverages in the *Drosophila* wing Somatic Mutation And Recombination Test. *Food Chem. Toxicol.* 32(5):423-30

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.

Guicheney, A., Distel, R., Delahousse, J. y Ramanoudjane, K.V. (1969) Suicide attempts by ingestion of *Thevetia neriifolia* seeds. *Presse Med.* Nov, 22; 77 (49): 1823-1824.

Guil, J.L., Rodríguez, G.I. y Torija, E. (1997) Nutritional and toxic factors in selected wild edible plants. *Plant Foods Hum. Nutr.* 51 (2): 99-107.

Holzinger, F., Frick, C. y Wink, M.(1992) Molecular basis for the insensitivity of the Monarch (*Danaus plexippus*) to cardiac glycosides. *FEBS.* 314(3): 477-480.

Hriscu, A. Stanescu, U., Ionescu, A. y Verbuta, A. (1990) A Pharmacodynamic investigation of the effect of polyholozidic substances extracted from *Plantago* sp. on the digestive tract. *Rev. Med. Chir. Soc. Med. Nat. Iasi.* Jan; 94 (1): 165-170.

Index Merck (1989) Encyclopedia of chemical, drugs and biologicals. Publish by Merck and Co. Inc. Rahway. N. U.S.A. 11 ed. 1606 pp.

IPCS (1985) Guide to short-term test for detecting mutagenic and carcinogenic chemicals. *Environ. Health Criteria* 51. WHO, Geneva, pp. 14-15.

Jurado, J., Duran, A.E., Moraga, A.A. y Pueyo, C. (1991) Study on the mutagenic activity of 13 bioflavonoids with the *Salmonella* Ara test. *Mutagenesis*. 6(4): 289-95.

Karpilovskaia, E.D., Gorban, G.P., Pliss, M.B., Zakharenko, L.N. y Gulich, M.P. (1989) Inhibiting effect of the polyphenolic complex from *Plantago major* (plantastine) on the carcinogenic effect of endogenously synthesized nitrosodimethylamine. *Farmakol. Toksikol.* Jul; 52 (4): 64-67.

Laval, J., Boiteux, S. y O' Connor, T.R. (1990) Physiological properties and repair of apurinic/apyrimidinic sites and imidazole ring-opened guanine in DNA. *Mutation Res.* 233: 73-79.

Lindsley, D.L. y Zimm, G. (1992) The genome of *Drosophila melanogaster*. Academic, Press, Inc. U.S.A. 113 pp.

Lithander, A. (1992) Intracellular fluid of waybread (*Plantago major*) as a prophylactic for mammary cancer in mice. *Tumor. Biol.* 13(3): 138-141.

Lozoya, X. y Lozoya, M. (1982) Flora medicinal de México. Primera parte: Plantas indígenas. IMSS. México. 309 pp.

Lozoya, X., Aguilar, A. y Camacho, J. (1987) Encuesta sobre el uso actual de plantas en

la medicina tradicional mexicana. *Rev. Med. IMSS (México)*. 25: 283-291.

Lozoya, X. y Velázquez, G. (1988) Medicina tradicional en México: la experiencia del programa IMSS-COPLAMAR. IMSS. México.

Madhavan, M.M. y Schneiderman, H.A. (1977) Histological analysis of the dynamics of growth of imaginal discs and histoblast nests during the larval development of *Drosophila melanogaster*. *Roux's Arch. Dev. Biol.* 183: 269-305.

Maldonado, L.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.

Maldonado, L.J. (1997) Caracterización genotóxica de la alfa-asarona y algunos compuestos relacionados en células somáticas de *Drosophila melanogaster*. *Tesis de Maestría*. Facultad de Ciencias, UNAM. 78 pp.

Margison, G.P. y O'Connor, P.J. (1979) Nucleic acid modification by N-Nitroso compounds, En: Chemical carcinogens and DNA (P.L. Grover, Ed) CRC Press, Boca raton (Florida), Vol. I, 111-160.

Martínez, M. (1959) Las plantas medicinales de México. Ediciones Botas. México. 656 pp.

Matev, M., Angelova, I., Koichev, A., Leseva, M. y Stefanov, M. (1982) Clinical trial of a *Plantago major* preparation in the treatment of chronic bronchitis. *Vutr. Boles.* 21 (2): 133-137.

Mitchell, M.J., Keogh, D.P., Crooks, J.R. y Smith, S.L. (1993) Effects of plant flavonoids and other allelochemicals on insect cytochrome P-450 dependent steroid hydroxylase

activity. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 23(1): 65-71.

Muñoz, M.J.A. (1994) Caracterización del potencial genotóxico y protector de *Ipomea orizabensis* en células somáticas de *Drosophila melanogaster*. *Tesis de licenciatura*, Facultad de Ciencias, UNAM. 65 pp.

Murai, M., Tamayama, Y. y Nishibe, S. (1995) Phenylethanoids in the herb of *Plantago lanceolata* and inhibitory effect on arachidonic acid-induced mouse ear edema. *Planta Med.* Oct; 61 (5): 479-480.

Nagao, M, Morita, N., Yahagi, T. Shimizu, M., Kuroyanagi, M. Fukuoka, M., Yoshihira, K., Natori, S., Fujino, T. y Sugimura, T.(1981) Mutagenicities of 61 flavonoids and 11 related compounds. *Environ. Mutagenesis*, 3: 401-419.

Nöthinger, R, (1970) Sucrose density separation: a method for collecting large number of *Drosophila* larvae. *Dros. Inf. Serv.* 45: 177.

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, UNAM. 96 pp.

Ordaz, T.M.G. (1998) Caracterización de la actividad genotóxica del aminoácido azufrado taurina y algunos antagonistas mediante el empleo de células somáticas de *Drosophila melanogaster*. *Tesis de Maestría*, Facultad de Ciencias, UNAM. 110 pp.

Pahwa, R. y Chatterjee, V.C. (1990) The toxicity of yellow oleander (*Thevetia nerifolia* juss) seed kernels to rats. *Vet. Hum. Toxicol.* Dec; 32(6): 561-564.

Pamukcu, A.M., Yalciner, S., Hatcher, J.F. y Bryan, G.T. (1980) Quercetin, a rat

intestinal bladder carcinogen present in bracken fern (*Pteridium aquilinum*). *Cancer Res.*, : 3468-3472.

Pathare, A.V., Patil, R.R., Chikhalikar, A.A. y Dalvi, S.G. (1987) Rare poisoning with cerebra thevetia (a case report). *J. Postgrad. Med.* Oct; 33(4): 216-218.

Pearson, M.J. (1974) The abdominal epidermis of *Calliphora erythrocephala* (Diptera) y Polyteny and growth in the larval cells. *J. Cell. Sci.* 16:113-131.

Pomerai, D.D. (1990) From gene to animal: An introduction to the molecular development. Cambridge University Press. 2 de. Nueva York, 417 pp.

Ponce, M.M., Navarro, A.I., Martínez, G.M.N. y Alvarez, Ch.R. (1994) *In vitro* effect against *Giardia* of 14 plants extracts. *Rev. Invest. Clin.* Sep; 46 (5): 343-347.

Ramos, P., Abundis, H., Gaytán, J.C., Ordaz, M.G., Orozco, P.G., Maldonado, J., Hernández, J., González, E., Reyes, P., Galicia, E.M., y Muñoz. J.A. (1993) Manual de Laboratorio de Genética para *Drosophila melanogaster*. Mc Graw-Hill, México. 131 pp.

Ramos, P., Ordaz, G., Maldonado, J., Muñoz, A., E. Gonzalez, A., Abundis, H.M. Campos, A., Martínez, M., Páez, Y., Islas, M., Gaytán, J., Orozco, P., Hernández, B., Dorantes, Y., Rivas, H., Muñoz, A. e Jiménez, I. (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.* Pag. 5.

Ramos, R.A., De la Torre, R.A., Alonso, N., Villaescusa, A., Betancourt, J. y Visozo, A. (1996) Screening of medicinal plants for induction of somatic segregation activity in *Aspergillus nidulans*. *J. Ethnopharmacol.* Jul. 5; 52(3): 123-127.

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

Samal, K.K., Sahu, H.K., Kar, M.K., Palit, S.K. Kar, B.C. y Sahu, C.S. (1989) Yellow oleander (cerebra thevetia) poisoning with jaundice and renal failure. *J. Assoc. Physicians India*. Mar; 37 (3): 232-233.

Saraswat, D.K., Garg, P.K. y Saraswat, M. (1992) Rare poisoning with cerebra thevetia (yellow oleander): Review of 13 cases of suicidal attempt. *J. Assoc. Physicians India*. Sep; 40(9): 628-629.

Saravanapavanathan, N. y Ganeshamoorthy, J. (1988) Yellow oleander poisoning - - a study of 170 cases. *Forensic Sci. Int.* Feb; 36 (3-4): 247-250.

Shaw, D. y Pearn, J. (1979) Oleander poisoning. *Med. J. Aust.* Sep 8; 2 (5): 267-269.

Shipochliev, T. (1981) Uterotonic action of extracts from a group of medicinal plants. *Vet. Med. Nauki*. 18 (4): 94-98.

Shipochliev, T., Dimitrov, A. y Aleksandrova, E. (1981) Anti-inflammatory action of a group of plant extracts. *Vet. Med. Nauki*. 18 (6): 87-94.

Suffness, M y cols. (1988) The utility of P388 leukemia compared to B16 melanoma and colon carcinoma 38 for *in vivo* screening of plant extracts. *Phytother. Res.* 2(2): 89-97.

Suhonen, R., Kantola, I. y Bjorksten, F. (1983) Anaphylactic shock due to ingestion of psyllium laxative. *Allergy*. Jul; 38 (5): 363-365.

Tapia, A.R., Astudillo, V.A., Uribe, H.R. González, R.C. y Velasco, L.R. (1996) Resultados preliminares del efecto de *Solanum torvum* y *Plantago major* sobre la proliferación de células hematopoyéticas *in vitro* e *in vivo*. *Memorias del Primer Congreso Nacional de Plantas Medicinales de México*. Pags. 102-104.

Thomson, W.A.R. (1980) Las plantas medicinales. Ed. Blume. México. 220 pp.

Villacis, L. (1978). Plantas Medicinales de México. Época. México. 165 pp.

Vogel, E. y Natarajan, A. (1979a) The relation between reaction kinetics and mutagenic action of monofunctional alkylating agents in eukaryotic systems. I. Recessive lethal mutations and translocations in *Drosophila melanogaster*. *Mutation Res.* 62: 51-100.

Vogel, E. y Natarajan, A. (1979b) The relation between reaction kinetics and mutagenic action of monofunctional alkylating agents in eukaryotic systems. II. Total and partial sex chromosome loss in *Drosophila melanogaster*. *Mutation Res.* 62: 101-123.

Wilkins, A.S. (1986) Genetic analysis of animal development. John Wiley and Sons (Eds.) Nueva York, 1500 pp.

Würgler, F., Graf, U., Frei, H. y Juon, H. (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.

Zhang, X.W., Huang, Z.Q. y Li, C.C. (1994) Antitumor activity of thevetoside alone and in combination with chlormethine *in vivo*. *Chung Kuo Yao Li Hsueh Pao*. May; 15 (3): 285-8.

Zimmering, S. (1976) Utility of *Drosophila melanogaster* for detection of potencial