



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---



**FACULTAD DE CIENCIAS**

**Determinación del efecto genotóxico del orégano  
cimarrón (*Poliomintha longiflora*) en la Prueba de  
Mutación y Recombinación Somática (SMART)  
en *Drosophila melanogaster*.**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**B I Ó L O G A**

**P R E S E N T A**

**ELIZABETH ROMERO GUTIÉRREZ**

**DIRECTORA DE TESIS:**

**M. en C. MARÍA GUADALUPE ORDAZ TÉLLEZ**

**MÉXICO, D. F. 2011**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

1. Datos del alumno	1. Datos del alumno
Apellido paterno	Romero
Apellido materno	Gutiérrez
Nombre(s)	Elizabeth
Teléfono	57 10 96 92
Universidad Nacional Autónoma de México	Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias	Facultad de Ciencias
Carrera	Biología
Número de cuenta	303038254
2. Datos del tutor	2. Datos del tutor
Grado	M. en C.
Nombre(s)	María Guadalupe
Apellido paterno	Ordaz
Apellido materno	Téllez
3. Datos del sinodal 1	3. Datos del sinodal 1
Grado	Dra.
Nombre(s)	Rosario
Apellido paterno	Rodríguez
Apellido materno	Arnaiz
4. Datos del sinodal 2	4. Datos del sinodal 2
Grado	M. en C
Nombre(s)	María Eugenia Isabel
Apellido paterno	Heres
Apellido materno	Y Pulido
5. Datos del sinodal 3	5. Datos del sinodal 3
Grado	Dra.
Nombre(s)	Angélica Graciela
Apellido paterno	Martínez
Apellido materno	Hernández
6. Datos del sinodal 4	6. Datos del sinodal 4
Grado	Q. A.
Nombre(s)	Verónica
Apellido paterno	Muñoz
Apellido materno	Ocotero
7. Datos del trabajo escrito.	7. Datos del trabajo escrito
Título	Determinación del efecto genotóxico del orégano cimarrón ( <i>Poliomintha longiflora</i> ) en la Prueba de Mutación y Recombinación Somática (SMART) en <i>Drosophila melanogaster</i>
Número de páginas	81 p
Año	2011

## ÍNDICE

1	<b>RESUMEN</b> .....	4
2	<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	6
	Toxicología.....	6
	Metabolismo de sustancias toxicas.....	9
	Toxicología Genética.....	13
	Ensayos de detección de genotóxicos.....	15
3	La herbolaria en México.....	17
4	<i>Poliomintha longiflora</i> .....	20
5	<i>Drosophila melanogaster</i> como modelo en la biología.....	24
6	Ciclo de vida de <i>Drosophila melanogaster</i> .....	25
7	Ensayo de Mutación Somática y Recombinación Mitótica (SMART) en <i>Drosophila melanogaster</i> modalidad alas.....	29
8	<b>JUSTIFICACIÓN</b> .....	32
7	<b>OBJETIVO GENERAL</b> .....	33
	Objetivos particulares.....	33
8	<b>HIPÓTESIS</b> .....	33
9	<b>MATERIAL Y MÉTODO</b> .....	34
	Población de estudio .....	34
	Extractos acuosos.....	34
	Ensayos de toxicidad y genotoxicidad.....	36
	Cepas utilizadas.....	36
	Ensayo de Toxicidad.....	37
	Ensayo de Mutación Somática y Recombinación Mitótica (SMART).....	38
	Detección de grupos químicos de metabolitos secundarios.....	43
10	<b>RESULTADOS</b> .....	46
	Ensayos de Toxicidad y Genotoxicidad.....	46
	Ensayos de Toxicidad .....	47
	Ensayo SMART .....	48
	Detección de grupos químicos de metabolitos secundarios.....	51
11	<b>DISCUSIÓN</b> .....	56
12	<b>CONCLUSIONES</b> .....	61
13	<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	62

## 1. RESUMEN.

En la actualidad México ocupa uno de los primeros lugares a nivel mundial en el número de plantas medicinales registradas que va de entre las 3,000 a 5,000 especies. Una de estas plantas es *Poliomintha longiflora*, un arbusto perenne de la familia Lamiaceae, nativo de Norte América. En el país se distribuye al norte y centro. Conocido comúnmente como orégano cimarrón, se utiliza para condimentar alimentos, tratar dolores estomacales, respiratorios y musculares.

*Poliomintha longiflora* (colectada en el estado de Hidalgo y proporcionada por Bye R. y Linares E.) se estudió en este trabajo para determinar el riesgo tóxico y genotóxico del uso de extractos acuosos (en dos modalidades, infusión al 1%, 5% y 10% y decocción al 10%). También se realizó una determinación cualitativa de metabolitos secundarios presentes en la especie por pruebas coloridas y de precipitación.

Para el ensayo de toxicidad se elaboraron extractos acuosos de *Poliomintha longiflora*: infusión -decocción de corto tiempo- de 1, 5 y 10% y decocción 10%, a los que se expusieron larvas de 72 horas  $\pm$  3 horas de edad. Al emerger los adultos se determinó la sobrevivencia de los individuos. Los resultados indicaron una sobrevivencia mayor al 80% en todas las concentraciones probadas.

Para el ensayo de genotoxicidad SMART, se utilizaron larvas *mwh + /+ flr<sup>3</sup>*, de 72  $\pm$  3 horas de edad, que fueron expuestas a tratamientos crónicos, vía alimentación, (medio instantáneo "Carolina"), con extractos acuosos de

*Poliomintha longiflora* (infusión 1, 5 y 10 % y decocción 10%) y al control negativo concurrente (agua). Al emerger los adultos, se realizaron preparaciones de las alas, éstas se observaron al microscopio y se registró la presencia de manchas en las alas localización, tipo y tamaño, de acuerdo con Graf *et al.*,1984. Los resultados se analizaron con el programa SMART PC-VERSION 2.1. No se encontraron diferencias significativas en la frecuencia de manchas obtenidas entre los tratamientos y el control. Por lo cual se puede decir que *Poliomintha longiflora* no es genotóxica bajo las condiciones probadas en este trabajo.

En la determinación cualitativa de grupos de metabolitos se detectó presencia de terpenos, fenoles, flavonoides y glucósidos en extractos orgánicos y acuosos.

## **2. INTRODUCCIÓN.**

### **2.1. TOXICOLOGÍA.**

Desde la antigüedad se ha reconocido la existencia de sustancias que causan efectos dañinos en los seres vivos (Bello y López de Cerain, 2001). Existen numerosos registros como el papiro de Ebers (1500 a.C.); documentos escritos por Hipócrates, Teofrasto, Dioscórides, Miamónides y Giacomini, entre otros, que hacen referencia a un gran número de venenos como la cicuta y el opio (Domínguez, 1983; Bello y López de Cerian, 2001). Este conocimiento siguió enriqueciéndose a lo largo de la historia, basado en la experiencia empírica del efecto nocivo de algunas sustancias aplicadas a diversas actividades como la caza, la guerra o envenenamientos, algunas vinculadas a un tono de misterio e incluso mágico. Fue hasta el siglo XIX que el español Mateo Orfila, considerado el padre de la toxicología moderna, introdujo las metodologías científicas en el abordaje del estudio de las sustancias dañinas. Su libro titulado *Toxicología General*, marcó el comienzo de esta ciencia (Bello y López de Cerain, 2001).

La toxicología es la ciencia encargada del estudio de los agentes físicos, químicos o biológicos que son capaces de actuar sobre los organismos, reduciendo sus funciones o afectando su sobrevivencia, así como de la descripción y comprensión de las acciones nocivas, con el objetivo de alcanzar una mejor comprensión de los mecanismos bioquímicos y fisiológicos que rigen estas interacciones para detectar, tratar y prevenir algún daño. Para lo cual se ha

dividido en diferentes ramas (Tabla 1) y creado diferentes procedimientos y medios que permiten detectar e identificar dichos agentes y su toxicidad (Repetto, 1995; Repetto y Repetto, 2009; Bello y López de Cerian, 2001; Bayantine, 2005; García, 2008).

**Tabla 1** *Principales Ramas de la Toxicología (tomado de Bello y López de Cerian 2001).*

---

<b>Toxicología clínica</b>	Se encarga del tratamiento para contrarrestar los efectos tóxicos en los seres humanos.
<b>Toxicología ocupacional</b>	Se ocupa de las intoxicaciones laborales, ya sean accidentales o resultantes del ambiente o de las labores cotidianas.
<b>Toxicología del medio ambiente</b>	Se ocupa de los efectos dañinos en el ambiente físico y el biológico.
<b>Toxicología alimentaria.</b>	Esta rama se hace cargo del estudio de contaminantes en los alimentos en un sentido amplio, investiga los procesos involucrados en la producción, industrialización, y hábitos alimenticios.
<b>Toxicología genética</b>	Se encarga del estudio de las sustancias tóxicas que inducen daños en el material genético.
<b>Toxicología forense</b>	Se encarga de los aspectos médicos-legales del uso de agentes tóxicos sobre los seres humanos.

---

En perspectiva, la toxicología se encarga del estudio del origen, propiedad y actividad de las sustancias dañinas: de los efectos de las interacciones de éstas y su receptor en los casos determinados, la relación dosis – respuesta, la relación dosis - efecto, los efectos a exposiciones crónicas y agudas, la selectividad de la acción, niveles sin efectos dañinos y protección ante tóxicos (Bello y López de Cerian, 2001).



El comprender los mecanismos que originan toxicidad en los organismos es un procedimiento complejo. El conocimiento empírico permite, aún en la actualidad, que se reconozca el riesgo que representa la exposición a diversos compuestos y mezclas complejas que pueden provocar daños a la salud. Muestra de ello es la clasificación que se ha hecho de algunos productos como benéficos o venenosos. Sin embargo, desde un punto de vista científico, esto es insostenible, ya que no es posible delimitar estrictamente los productos buenos para la salud de los venenosos; lo que sí es posible es reconocer rangos de riesgo referente a la seguridad de uso (Bello y López de Cerain, 2001).

El término toxicidad se refiere a la acción dañina en el organismo al exponerse a determinado agente. Un tóxico es toda aquella sustancia que a determinadas concentraciones produce alteraciones pasajeras o permanentes incompatibles con la buena salud del organismo. Cuando corresponden a agentes exógenos al organismo suele llamárseles xenotóxicos, entre estos figuran los fármacos, las sustancias químicas industriales, los venenos presentes en la naturaleza y los contaminantes del ambiente, entre otros (Walker, 1998; Bello y López de Cerain, 2001; Peña *et al*, 2001, Silbergeld *et al*, 1998).

Hay que recordar respecto a esto, que para que se observe un efecto nocivo es necesario alcanzar cierta concentración, rebasando en cualquier caso, los niveles límites. Otro factor determinante, es la vía de administración, puesto que de ella depende la cantidad de sustancias dañinas que ingresan al organismo y

la velocidad de su distribución. Por último, el tiempo de exposición es esencial, de acuerdo a éste, el daño tóxico puede ser más o menos intenso (Bello y López de Cerian, 2001; Peña *et al.*, 2001).

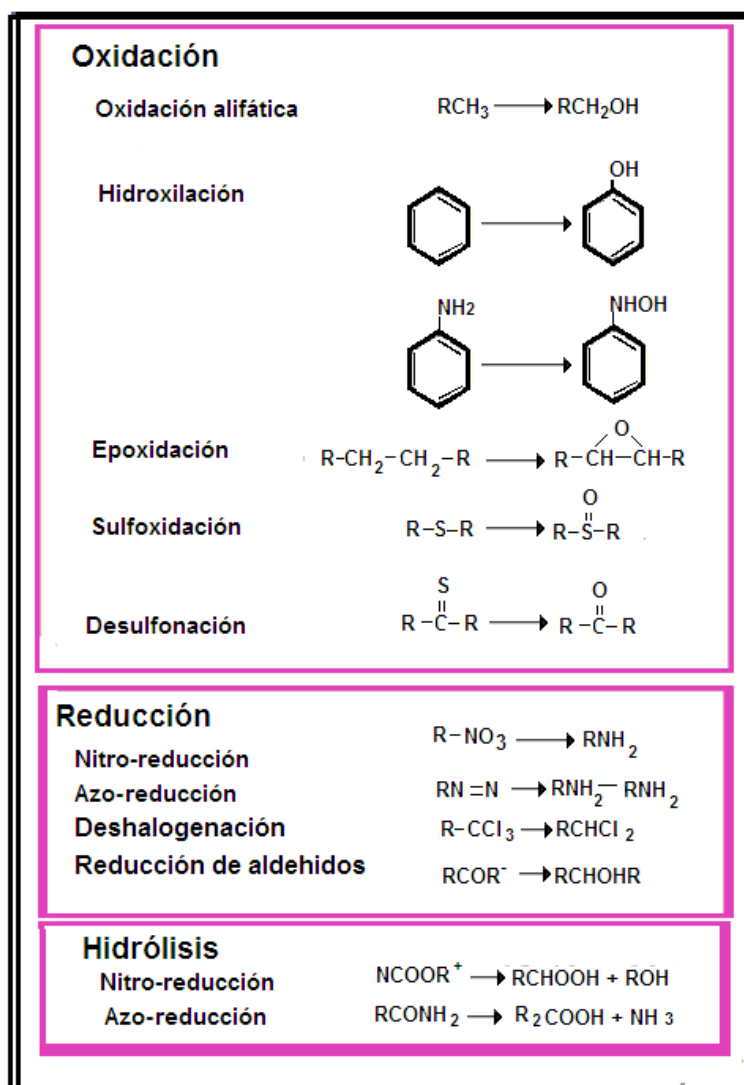
El efecto de un compuesto tóxico se puede clasificar en dos tipos: directo (cuando la estructura primaria del agentes es responsable del efecto que se observa en el organismo), o de efecto indirecto (resultante de la formación de algún o algunos metabolitos secundarios debidos a la interacción del agente en el organismo) (Peña *et al.*, 2001).

## **2.2. METABOLISMO DE SUSTANCIAS TÓXICAS.**

Si bien es cierto que no todas las especies poseen la misma información genética, los mecanismos de acción y reacciones metabólicas son prácticamente iguales en todos los organismos, aunque la capacidad bioquímica varía mucho en los distintos organismos (Peña *et al.*, 2001). La mayor parte de los procesos metabólicos que ocurren en los seres vivos referentes a los compuestos tóxicos, van encaminados a lograr su eliminación, para lo cual se pueden distinguir dos tipos de biotransformaciones: de Fase I o reacciones de oxidación, reducción o hidrólisis, y de Fase II o reacciones de conjugación o derivación (Peña *et al.*, 2001; Bello y López de Cerain, 2001).

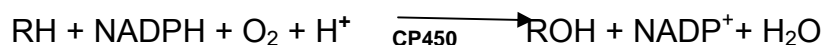
En la Fase I, las transformaciones ocurridas aumentan la polaridad de los compuestos, lo que disminuye los efectos tóxicos (García, 2008). Las reacciones mas frecuentes son: oxidación, hidroxilación, epoxidación, sulfoxidación,

desulfonación, nitro-reducción, azo-reducción, deshalogenación, reducción de aldehidos e hidrólisis (Figura.1) (Doménech, 1999; Capó, 2007; Peña *et al.*, 2001; García, 2008).



**Fig. 1. Reacciones químicas metabólicas de la Fase I (tomado de Doménech, 1999).**

Las reacciones de Fase I son catalizadas por enzimas de muy diversa naturaleza, entre los que se incluyen: los citocromos P450, las flavinmonoxigenasas, diversas oxidasas como las aminooxidasas, entre otras. Los citocromos P450 son el miembro más destacado, son hemoproteínas, que intervienen fundamentalmente en reacciones de oxidación aunque también catalizan reacciones de reducciones e hidrólisis. Los citocromos P450 requiere oxígeno molecular y NADPH para oxidar, su acción consiste en incorporar uno átomo de oxígeno en la molécula del substrato, mientras que el otro átomo es reducido a agua, como se puede ver en la siguiente reacción:

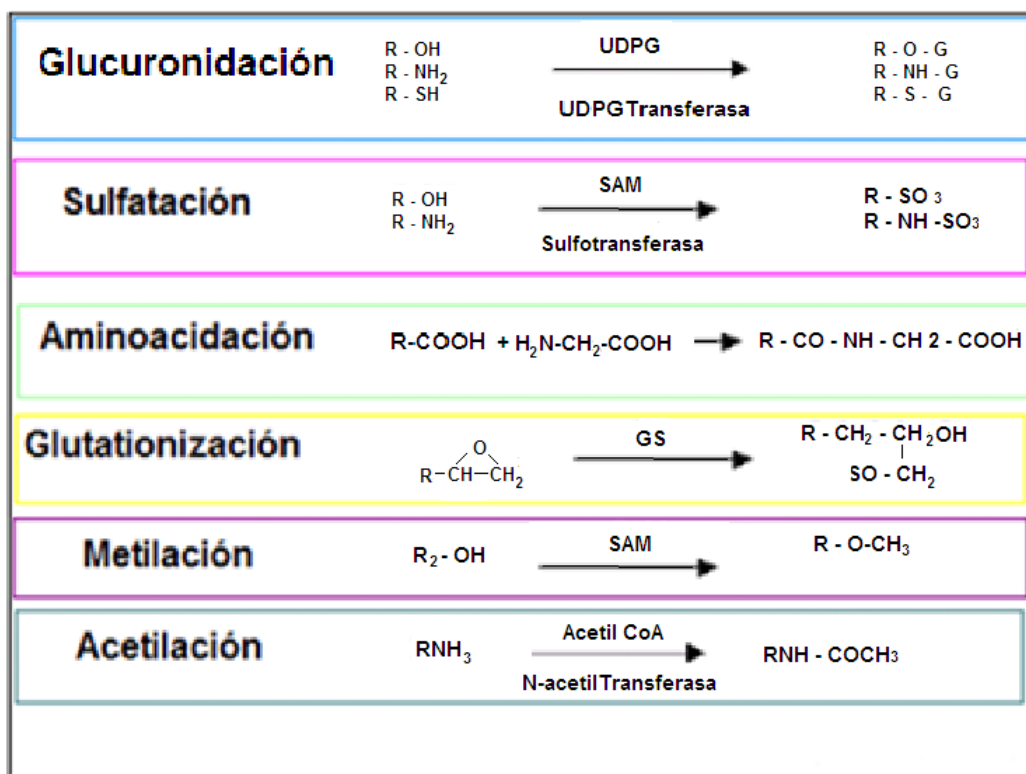


Los citocromos P450 se localizan en mayor proporción en el retículo endoplásmico liso y en mayor concentración en células del hígado y en células del intestino delgado (Repetto, 1995; García, 2008; Silbergeld *et al*, 1998; Reyes y Posada, 2006; Funch *et al.*, 1993; Scolt *et al.*, 1998).

Las reacciones de reducción más comunes son: la transformaciones de nitro-reducción de aromáticos a aminas, azoreducción de aminas primarias y la deshalogenación reductiva (Peña *et al*, 2001).

En la Fase II se dan otros procesos, que incrementan la hidrólisis, para facilitar la excreción de la sustancia tóxica, en la que los sustratos de inicio son los productos obtenidos de la Fase I. La mayoría de las enzimas que catalizan estas reacciones se localizan en el citosol. El nombre de las enzimas que catalizan las

reacciones de la Fase II, suele derivarse del radical endógeno que participa en conjugación por ejemplo: cuando hay una acetilación la enzima responsable es una N-acetiltransferasa. Las reacciones más comunes son la glucuronidación, sulfatación, aminoacidación, glutatiónización, metilación y acetilación (Figura 2) (Peña *et al.*, 2001).



**Fig.2. Reacciones químicas metabólicas de la Fase II (tomado de Peña *et al.*, 2001).**

A pesar de que estas reacciones van encaminadas a la eliminación de los agentes tóxicos, en algunos casos los compuestos intermediarios formados en cualquiera de las dos fases pueden dar lugar a metabolitos que pueden resultar dañinos, a este proceso se le denomina bioactivación. Como consecuencia se

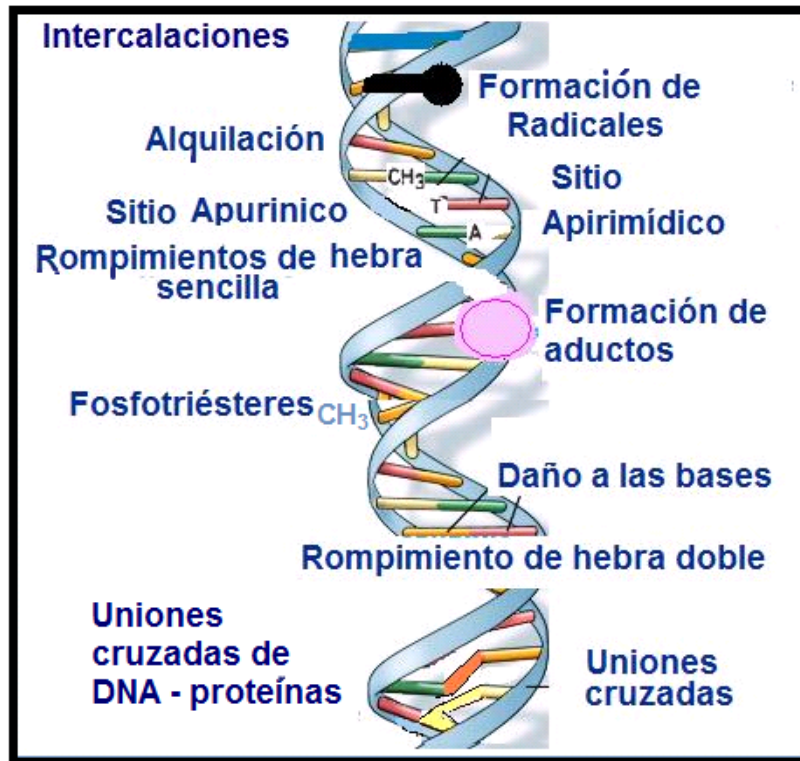
pueden formar especies muy reactivas que muestran gran afinidad por los elementos nucleofílicos de los ácidos nucleicos y/o proteínas (Peña *et al.*, 2001).

### **2.3. TOXICOLOGÍA GENÉTICA.**

El efecto producido por un agente tóxico puede ser originado por reacciones electrofílicas, en las que al conjugarse la sustancia dañina con componentes celulares (como proteínas y DNA) producen oxidación al saturar sus moléculas con electrones, provocando disfunciones en las células e incluso la muerte celular (Peña *et al.*, 2001).

Se considera como agente genotóxico a toda sustancia que produce alteraciones en los ácidos nucleicos y componentes asociados a nivel subtóxico resultando en la modificación de características hereditarias o inactivación del DNA (Ehrenberg *et al.*, 1978; Muñoz, 1998).

Los daños celulares que afectan la integridad del DNA pueden ocurrir como consecuencia de procesos biológicos normales dentro de un intervalo entre menos de uno y posiblemente hasta 100 errores por cada mil millones ( $10^9$ ) de nucleótidos replicados, también pueden ser inducidos por agentes físicos, químicos y biológicos (directa o indirectamente) o ser resultado de la alteración del metabolismo celular. En la figura 3, se indican los procesos por los cuales se puede modificar el DNA.



**Fig. 3. Daño al DNA inducido por agentes físicos y químicos ( tomado de Klaassen,2001).**

Dentro de la toxicología, la rama encargada del estudio, detección y evaluación de agentes físicos, químicos y biológicos sobre el material hereditario es la toxicología genética (Brusick, 1987; García, 2008), ésta, se ocupa de los efectos que ocasionan las genotoxinas, agentes que actúan con alta especificidad sobre los ácidos nucleicos causando un daño a la salud, que se puede ver reflejado, ya sea en las células germinales, ocasionando trastornos genéticos hereditarios o creando problemas de infertilidad, o bien en células somáticas, provocando muerte celular o enfermedades como el cáncer (Margolin, 1985; Vogel *et al.*, 1991; Klaassen, 2001; Vega y Reyes, 2006).

Los primeros estudios que han evaluado el efecto de algunos agentes en la integridad del material genético son los reportados por Müller en 1927, en sus trabajos aborda la inducción de mutaciones por los rayos X y su relación en la afectación de la sobrevivencia de *Drosophila melanogaster*; más tarde Stadler demuestra un efecto positivo en la inducción de mutaciones en plantas ocasionado por rayos X (Bello y López de Cerain, 2001; De la Rosa y Ruíz, 1997).

En 1942, Auerbach y Robinson demostraron la inducción de mutaciones en la mosca de la fruta por efecto del gas mostaza, con lo que se indica que algunos agentes químicos son capaces de alterar la estructura del material genético. A esta lista poco a poco se fueron descubriendo una gran cantidad de inductores de genotoxicidad a distintos niveles (De la Rosa y Ruiz, 1997).

#### **2.4. ENSAYOS DE DETECCIÓN DE GENOTÓXICOS.**

Los ensayos que evalúan el riesgo de daño por distintos agentes, fueron elaborados debido a la preocupación por conocer los efectos que la exposición a compuestos tóxicos pudieran tener sobre la integridad del genoma humano. Para lograr evaluar el riesgo de una sustancia, se han diseñado ensayos *in vivo* e *in vitro* (Tabla 2), que permiten analizar y cuantificar la información relacionada con riesgos, entre éstos encontramos el ensayo SMART, el cual ha sido usado por más de 14 años para estudios de evaluación de genotoxicidad de muchos compuestos como: carcinógenos, insecticidas, aditivos de alimentos, extractos



herbales y mezclas complejas (Rao *et al.*, 2000; Romero-Jiménez *et al.*, 2005; García, 2008:).

<b>Tabla 2. Ensayos de toxicidad y genotoxicidad</b>			
<b>Ensayo</b>	<b>Autor</b>	<b>Organismo</b>	<b>Descripción</b>
<b>Ensayo de Ames</b>	Ames <i>et al.</i> , 1973	<i>Salmonella typhimurium</i>	Ensayo de mutación recesiva, basado en la reversión del genotipo auxótrofo a protótrofo en cepas de <i>Salmonella typhimurium</i>
<b>Intercambio de cromátidas hermanas (SCE: Sister Chromatid Exchange).</b>	Solomon y Bobrow, 1975 Erickson <i>et al.</i> , 1980	Ratón, Rata , Humanos	Detecta el intercambio de DNA (o de hebras) en cromosomas en metafase
<b>Ensayo de micronúcleos (CBMN:cytokinesis-block micronucleus) .</b>	Schmid, 1975	Ratón, Rata, Humanos	Evalúa aberraciones cromosómicas, ganancia o pérdidas de fragmentos o cromosomas en células hijas. Producidos por ruptura cromosómica, errores en la replicación y división celular y/o por la acción de agentes genotóxicos.
<b>Ensayo COMETA (Single- Cell Gel Electrophoresis).</b>	Cook y Brazel, 1976 Östlins y Johoson, 1984 Collins, 2004 Dusinska y Collins, 2008	Puede usarse cualquier población de células Eucariotas	Método sensible para cuantificar daño en el DNA, células embebidas en un gel de agarosa son sometidas a lisis (alcalina o neutra) y a electroforesis. Las células con mayor daño del DNA muestran una migración desde el núcleo hacia el ánodo. Provee información del daño y reparación.
<b>Translocaciones heredables.</b>	Brusick., 1980	<i>Drosophila melanogaster</i> Ratón	Ensayo de dos generaciones sensible a detectar aberraciones cromosómicas recíprocas en 2 generaciones.
<b>Ensayo de letales recesivos ligados al sexo (SLRL).</b>	Lee <i>et al.</i> , 1983 Woodruff <i>et al.</i> , 1985 Vogel, 1987	<i>Drosophila melanogaster</i>	Evalúa modificaciones genéticas mutaciones y deleciones inducidas por xenobióticos en células germinales que de ser letales se reflejan en la falta de algún marcador fenotípico después de varias generaciones.
<b>Ensayo de manchas en ratón (Mouse spot test).</b>	Gocke <i>et al.</i> , 1983.	Ratón	Detecta mutaciones genéticas y recombinación somática, se basa en la observación de marcadores recesivos.
<b>Ensayo Mutación y Recombinación Somática (SMART).</b>	Graf <i>et al.</i> , 1984	<i>Drosophila melanogaster</i>	Prueba que evalúa eventos de recombinación y mutación somática inducida por xenobióticos

<b>Letales Autosómicos dominantes.</b>	Green y Auletta 1985 Sasser <i>et al.</i> , 1993	<i>Drosophila melanogaster</i> Ratón	Determina la eficacia del mutágenos, utilizando cruza sucesivas de <i>Drosophila melanogaster</i> con genes dominantes letales, se evalúa la tercera generación, observando las mutaciones.
<b>Ensayo de reparación del DNA (USD:</b>	<u>Burlinson</u> , 1989.	<i>Drosophila melanogaster</i>	La síntesis de DNA no programada (USD) es un ensayo que mide el daño al DNA por proceso de escisión y/o replicación post-replicativa.
<b>Ensayo de aberraciones cromosómicas (CA:Chromosome aberrations).</b>	Galloway, 1994.	Ratón Rata Humanos	Permite determinar el efecto clastogénico y/o aneugénico. Se basa en evidenciar cambios en la estructura de los cromosomas o en su número.

Estos y otros ensayos han sido empleados para la evaluación de riesgos en la salud humana por consumo de alimentos y medicamentos (incluyendo el consumo de plantas medicinales). Considerando que México es el segundo lugar a nivel mundial en el registro de plantas medicinales, su estudio para demostrar riesgos y beneficios y sobre todo, para garantizar a los médicos y a enfermos la seguridad de uso, es indudablemente relevante (Muñetón, 2009).

### **3. LA HERBOLARIA EN MÉXICO.**

La necesidad de aliviar padecimientos y enfermedades ha llevado al ser humano, desde sus orígenes, a la búsqueda de alternativas para lograr su bienestar. En un inicio las propiedades terapéuticas de las plantas fueron encontradas de forma empírica, un aprendizaje que llevó al hombre a distinguir beneficios y perjuicios al relacionarse con algunas plantas, que con el tiempo constituyó la medicina tradicional base de la herbolaria (Muñetón, 2009).

En todas las civilizaciones la medicina tradicional es muy utilizada, de acuerdo a estadísticas de la Organización Mundial de la Salud, el 70% de la población mundial hace uso de la herbolaria para tratar diversas enfermedades (Linares *et al.*, 1999; Jaime, 2007; Bye *et al.*, 1995; Castillo-Juárez *et al.*, 2009).

El interés actual en la medicina tradicional tiene sus orígenes en la insatisfacción hacia la medicina convencional, en cuanto a su acción insuficiente ante algunas enfermedades y los efectos secundarios que producen. Otro aspecto que influye, es el costo y la disponibilidad, factores sociales como el conservar las tradiciones y a la búsqueda de un estilo de vida más natural (González- Gaitán *et al.*, 2004).

En el territorio que actualmente ocupa México, la herbolaria fue usada por nuestros antepasados para el tratamiento de enfermedades, la riqueza de especies vegetales dotó a la población de un gran número de plantas aprovechables y generación tras generación este conocimiento fue transmitido, hoy en día aun se sigue haciendo uso de ella (Linares *et al.*, 1999).

La riqueza de plantas medicinales en México quedó registrada desde la antigüedad, en el Códice Badiano, escrito en náhuatl por Martín de la Cruz curandero indígena y traducido al latín por el indígena Juan Badiano, expone el amplio conocimiento y uso de las plantas para curar enfermedades. A partir de la traducción de este escrito durante la conquista, se impulsaron las exploraciones botánicas y la traducción de códices encaminadas a recopilar más información de las plantas medicinales (González *et al.*, 2004).

En la actualidad, México ocupa uno de los primeros lugares a nivel mundial en el número de plantas medicinales registradas, con un número de entre 3,000 y 5,000 especies. En cuanto a su uso, del total de la población mexicana el 90% admite utilizarla y de este amplio porcentaje el 50 % indica un uso exclusivo de esta medicina para curar sus padecimientos (Muñetón, 2009; Taiddei-Bringas *et al.*, 1999).

Al respecto, la legislación en México aprobó el uso de medicamentos herbolarios desde 1998 y en estados como Durango, Nayarit, Oaxaca, Puebla y Chiapas, la Secretaria de Salud aprobó la existencia de dos farmacias, la alópata y la de medicina tradicional herbolaria (Muñetón, 2009).

Los remedios medicinales pueden ser aplicados y preparados de formas muy variadas como: infusiones, decocciones, cataplasmas, tinturas, baños, compresas, ungüentos, jarabes, mezclas, etc. (Jaime, 2007; Castillo-Juárez *et al.*, 2009).

Los compuestos presentes en las plantas que les confieren propiedades biológicas que el hombre aprovecha para tratar diversos padecimientos, se conocen como principios activos, generalmente son derivados del metabolismo secundario de las plantas y algunos de estos intervienen en las interacciones ecológicas como defensa ante predadores, atracción de polinizadores, acción alelopática, etc. (González *et al.*, 2004; Daniel, 2006; Muñoz, 2002)

#### **4. *Poliomintha longiflora*.**

La especie *Poliomintha longiflora*, es una planta aromática utilizada en la medicina tradicional para combatir dolores estomacales, afecciones respiratorias (tratamiento de tos seca, laringitis y tosferina). También se utiliza como expectorante y antitusígeno, puede ser considerada un agente antibacterial de alto espectro. Se emplea en el tratamiento de dolores musculares, tortícolis y lumbago. Puede ser aplicada externamente en cataplasma o bebidas como infusiones dependiendo del caso (Jaime, 2007; Castillo- Juárez *et al.*, 2009).

Asimismo es usada para condimentar alimentos, como orégano. Y en los últimos años ha crecido el interés hacia ésta, como producto de comercialización por sus propiedades antimicrobianas, fungicidas, antioxidantes y saborizantes (Chaquilla, 2008; Garrido *et al.*, 2008).

Toda la planta es rica en un aceite esencial que contiene timol y carvacrol, de acción antiespasmódica, sedante y carminativa. Contiene asimismo, ácido rosmárico y ácido ursólico a los que se atribuyen sus propiedades antirreumáticas y capacidad antioxidante; contiene además, ácido vanillico, ácido cafeico, leutolina e hispidulina (Zheng y Wang, 2001; Jaime, 2007; Linares *et al.*, 1999; De Vicenzi *et al.*, 2004).

*Poliomintha longiflora* (Figura 4) pertenece a la familia Lamiaceae (Labiatae, nombre consenso) donde se agrupan muchas especies usadas con fines curativos, esta familia está formada por 224 géneros y 5600 especies. En México

se ubican 26 géneros y 512 especies. Los géneros presentes en México y su distribución se enlistan en la Tabla 3.

**Tabla 3. Distribución de los géneros de labiadas en México (Domínguez-Vázquez et al., 2002).**

Por su ubicación	Géneros
Californianos	<i>Acanthomintha, Monarda, Monardella, Pogogyne, Salvia. Audibertia y Trichostema</i>
Norteamericanos	<i>Agastache, Cunila, Hedeoma, Hesperozygis, Poliomintha, Physostegia y Tetraclea.</i> La mayor parte son taxa endémicos
Gondwana/ Sudamérica	<i>Asterohyptis, Catoferia, Chaunostoma, Hyptis, Lepechinia, Ocimum y Marsypianthes</i>
Laurásicas	<i>Salvia, Clinopodium, Scutellaria, Stachys y Teucrium</i>



**Fig. 4. Clasificación taxonómica e imagen de *Poliomintha longiflora* ( A. Gray).**

Los miembros de la familia son principalmente herbáceas y arbustos, de tallos tetraangulares, hojas simples, opuestas y decusadas. Generalmente las plantas están cubiertas de tricomas y de glándulas. El cáliz y pétalos se encuentran

fusionados, sus flores son de tipo cimoso. El fruto son nueces indehiscentes con una semilla (Domínguez-Vázquez *et al.*, 2002). Los miembros de la familia se encuentra en una gran cantidad de climas, se considera de distribución cosmopolita, especialmente diversa en regiones mediterráneas y hacia el este de Asia central, también crecen de forma silvestre en África y América (Robledo, 1990).

*Poliomintha longiflora* como otros oréganos crece en altitudes desde 1500 hasta 3000 m.s.n.m. En general los oréganos silvestres crecen en suelos de tipo basáltico, calizo, arcilloso, arenoso o rocoso con pH ligeramente ácido o alcalino, en terrenos de agostadero en lomeríos, laderas, barrancas y en general en suelos ondulados y accidentados en terrenos con pendientes de más del 20% (o terrenos con inclinaciones de más de  $11.31^\circ$ ), el clima puede ser seco, semidesértico, semicálido húmedo o templado subhúmedo, con precipitación anual de entre 500 y 900 mm (Robledo, 1990).

*Poliomintha longiflora* es conocida como orégano mexicano, orégano de Monterrey, orégano de Nuevo León, orégano del cerro, orégano cimarrón, orégano cenizo y orégano silvestre (Alanís-Flores, 2008). Se encuentra en montañas, laderas y cañadas, al norte de México en Nuevo León, San Luis Potosí, Coahuila, Tamaulipas, Zacatecas y al sureste de México en Hidalgo (Figura 5) (Robledo, 1990; Benavides, 1991; Glafiro, 2004; Harrison, 2006; Castillo, 1986; González *et al.*, 2007; Goyenechea, 2008; Garrido *et al.*, 2008; Hernández *et al.*, 1991; Aranda *et al.*, 2005; 2006; 2008; 2009).



Fig. 5. Mapa de la distribución de *Poliomintha longiflora* en México.

*Poliomintha longiflora* en estado silvestre es componente del matorral desértico, se desarrolla en regiones áridas y semiáridas de litosol eútrico (suelos delgados y pedregosos), y de textura migajo-arcilloarenosa, en pendientes pronunciadas de 30 al 60% (terrenos con inclinaciones de entre 17° a 31°), de exposición norte, entre los 1500 a 2800 msnm, de pH ligeramente alcalino, con gran cantidad de materia orgánica y moderada de carbono (Castillo, 1986; Robledo, 1990; Hernández *et al.*, 1991).

Es un arbusto o semiarbusto perenne, con una altura entre 0.5 a 1.5 metros de tallo leñoso en su base, con numerosas ramificaciones, posee hojas opuestas con glándulas aromáticas, su floración aparece en primavera es de color púrpura a rosa (Glafiro, 2004). Las poblaciones naturales de esta especie están



amenazadas por sobreexplotación, empobrecimientos del suelo, sobrepastoreo, incendios y heladas (Glafiro, 2004).

## **5. *Drosophila melanogaster* COMO ORGANISMO MODELO EN LA BIOLOGÍA.**

La mosca de la fruta es uno de los modelos eucariontes más ampliamente utilizado en genética y otras ramas de la biología por muchas razones. Particularmente a nivel genético y genómico, entre las ventajas que ofrece se cuentan: la facilidad que implica su manejo y mantenimiento de bajo costo, ciclo de vida corto, que permite evaluar varias generaciones, una abundante descendencia, así como el conocimiento total de su genoma, a lo que se suma el diseño y disponibilidad de un gran número de técnicas y herramienta para su análisis (Tabla 1) (Amorós, 2001; Adams *et al.*, 2000).

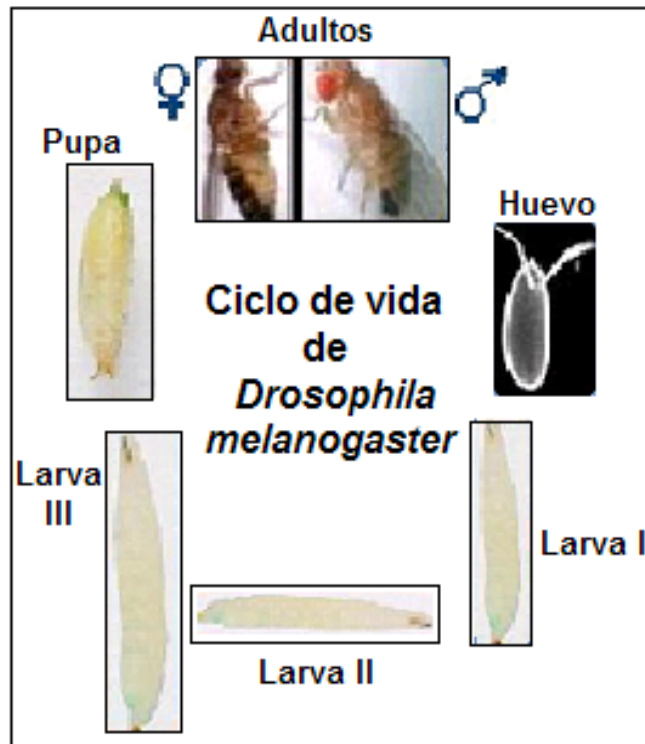
Otra de las ventajas es que se cuentan con numerosas cepas mutantes, disponibles en los bancos de *Drosophila*, que constituyen un poderoso medio para analizar procesos biológicos complejos (Török *et al.*, 1993; Rorth, 1996; Deák *et al.*, 1997; Amorós, 2001). Sumado a lo anterior se sabe que *Drosophila melanogaster* comparte algunas semejanzas con el humano, como la capacidad de efectuar reacciones metabólicas, que el hígado realiza en los mamíferos y donde se lleva acabo la activación metabólica de muchos mutágenos, además al comparar el genoma humano con el de *Drosophila melanogaster* se ha demostrado que cerca del 60% de los genes humanos que están implicados en algún tipo de enfermedad, tienen equivalente en la mosca de la fruta, sumado a

esto aproximadamente el 50% de las proteínas de la mosca muestran semejanzas con las proteínas de mamíferos, así como por la persistencia de rutas constitutivas para el metabolismo de xenobióticos. Este tipo de similitudes hacen de *Drosophila* un buen modelo para estudiar alteraciones genéticas. (Baars *et al.*, 1980; Vogel *et al.*, 1991; Rodríguez-Arnaiz y Ramos, 1992; Wilson, 2001; Palomenque *et al.*, 2001).

### **5.1. CICLO DE VIDA DE *Drosophila melanogaster*.**

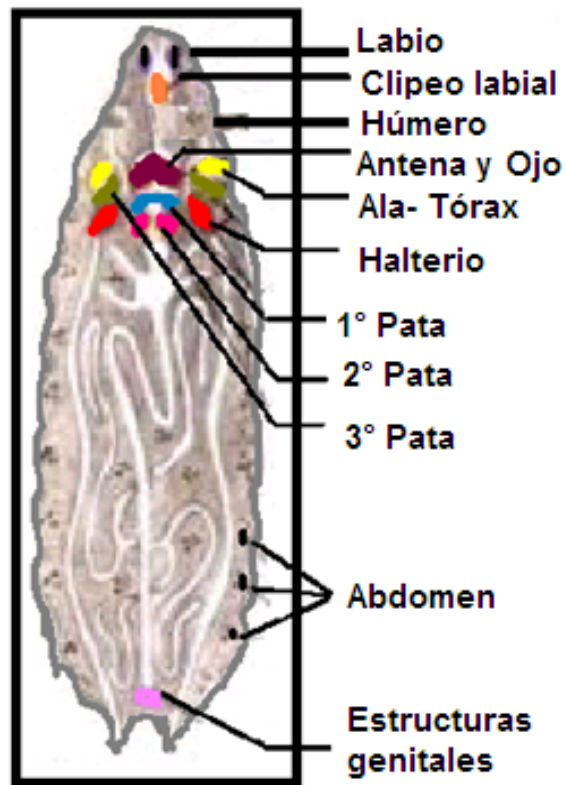
El ciclo de vida de este organismo dura de 9 o 10 días a una temperatura de 25°C y con una humedad relativa del 80%, es un insecto holometábolo, es decir pasa por cuatro fases en su desarrollo: huevo, larva, pupa y adulto (Ingham, 1988; Johnston y Nüsslein-Volhard, 1992; Amorós, 2001).

El ciclo inicia con la fecundación del óvulo y formación del huevo, período embrionario que dura unas 24 horas, del cual emerge una larva que presentara tres estadios con dos mudas, el tercer estadio termina con la pupación, para este momento habrán transcurrido cuatro días. En la pupación se lleva acabo la organogénesis del adulto y dura 96 horas. De la pupa emerge el adulto, éste es el período reproductivo del organismo, las moscas adultas pueden vivir aproximadamente 60 días a 25°C (Figura 6) (Ingham, 1988; Johnston y Nüsslein-Volhard, 1992; Amorós, 2001).



**Fig. 6. Ciclo de vida de *Drosophila melanogaster*.**

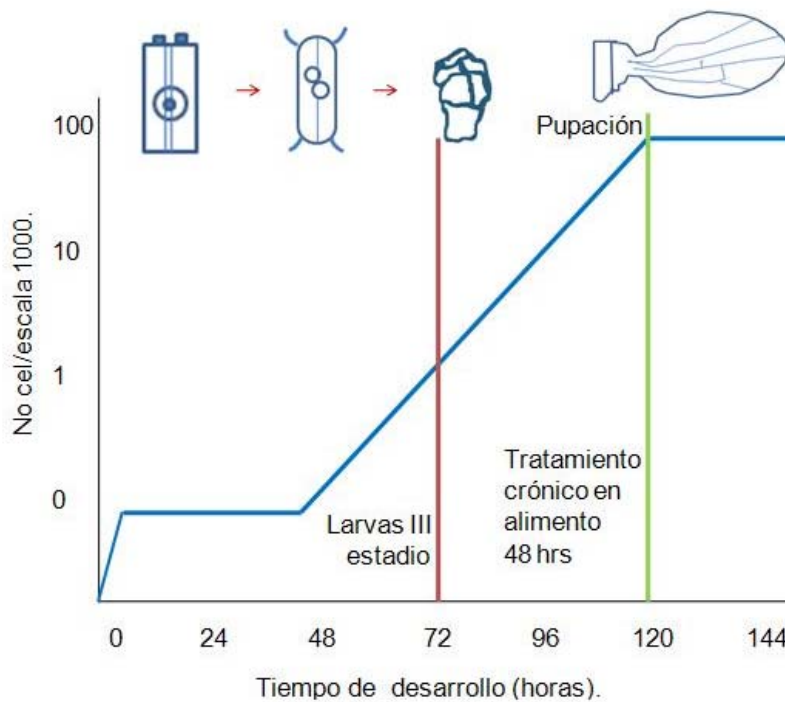
En la fase larvaria, se pueden distinguir dos linajes celulares: las células larvarias y las células imaginales (Figura 7). Las primeras se encargan de la formación de las estructuras larvarias. En cambio los discos imaginales son pequeños sacos de células que se encuentran en el interior de la larva y dan lugar a las estructuras externas de los adultos, estos sacos están compuestos de epitelio unicelular cilíndrico que al cambiar a células cúbicas por aplanamiento en procesos de evaginación o eversión, forman las estructuras externas de los adultos (Fristrom y Fristrom, 1975). En la fase larvaria estas células no se han diferenciado, pero continúan dividiéndose, aumentando su número (Bate y Martínez-Arias, 1991; Cohen, 1993; Fristrom y Fristrom, 1975; Amorós, 2001).



**Fig. 7. Larva con discos imaginales (tomado de Amorós, 2001).**

Los precursores de los discos imaginales son un grupo de 10 a 40 células que varían de acuerdo al disco imaginal del que se trate, éstas inician su diferenciación en la metamorfosis (Amorós, 2001). El ala de *Drosophila melanogaster* puede ser un modelo de utilidad para analizar el desarrollo. El disco imaginal del ala es un saco epidermal de una capa que dará lugar al segundo segmento torácico del adulto. El primordio del ala es de origen ectodérmico formado por un grupo de 40 células que proliferan hasta alcanzar las 25,000 células por ala aproximadamente. A las 40 horas tras la formación del pupario las alas tienen ya la forma general del ala adulta donde se pueden

diferenciar cuatro componentes básicos: las estructuras del margen, las venas, las regiones de intervena y estructuras neurales del ala (Figura 8) (Lawrences y Struhl, 1996; García-Bellido y Merriam, 1971; González-Gaitán *et al.*, 1994; García-Bellido, 1977; García- Bellido *et al.*, 1973; Milán *et al.*, 1996; Amorós, 2001; Martín y Morata, 2006).



**Fig. 8. Desarrollo del disco imaginal del ala en *Drosophila melanogaster* (tomado de Amorós, 2001).**

Las células del disco imaginal del ala crecen de forma exponencial desde el comienzo del período larvario hasta la formación del pupario. Un total de 15,6 divisiones es necesario para completar el número total de células adultas. El patrón de la proliferación celular del disco imaginal del ala en *Drosophila*

*melanogaster* es espacial y temporalmente heterogéneo, la tasa de división es constante en los períodos de intermuda, pero disminuye durante los períodos de muda. El promedio de duración del ciclo celular para el período larvario, es de aproximadamente 8 horas 30 minutos (García-Bellido y Merriam, 1971; Martín y Morata, 2006).

El ala adulta está constituida por 2 capas de células epidérmicas continuas (un epitelio dorsal y uno ventral). Las únicas células que permanecen vivas en el adulto son las células de la vena. Las células de intervena se adhieren entre ellas y mueren rápidamente después que el adulto emerge, dando lugar a una cutícula transparente (Amorós, 2001).

## **6. ENSAYO DE MUTACIÓN Y RECOMBINACIÓN SOMÁTICA (SMART) EN *Drosophila melanogaster* MODALIDAD ALA.**

El ensayo SMART (por sus siglas en inglés Somatic Mutation and Recombination Test) es una prueba comúnmente usada para medir la genotoxicidad de diversos agentes físicos y/o químicos. Fue propuesto en 1974 por Mollet y Würigler, el protocolo para la modalidad ala fue desarrollado por Graf *et al.*, en 1984.

Este ensayo es versátil y un sistema confiable que se ha usado tanto para evaluar mezclas complejas como compuestos simples (Romero-Jiménez *et al.*, 2005; Déciga-Campos *et al.*, 2007; Esparza-Garrido, 2000; Spanó, 2001).

En el ensayo de SMART, los organismos que se exponen a los tratamientos son larvas de  $72 \pm 3$  horas de edad, que proceden de la cruce de dos cepas que poseen marcadores recesivos para los tricomas de las células de las alas, que se encuentran en el cromosoma tres: *mwh* (tricomas múltiples por célula, ubicado en 3-0.3) y *flr<sup>3</sup>* (tricomas en forma de flama, localizado en 3-38.8).

Este ensayo se basa en medir la pérdida de la heterocigosis de uno o de los dos marcadores que afectan el fenotipo de los tricomas de las alas, al ser expuesto a un agente genotóxico.

El resultado se obtiene al compararse con un testigo concurrente y hacer una correlación entre el tamaño, tipo y frecuencia de las manchas de células afectadas. Las manchas que se producen son ocasionadas por diversos eventos genéticos: mutación puntual, deleciones, no disyunción y recombinación somática (Figura 9) (Graf *et al.*, 1984).

Para este ensayo es posible usar una cruce especial, de alta bioactivación (HB) que se caracteriza por tener una alta expresión de citocromos P450 que son los responsables de la biotransformación de muchos xenobióticos, o la cruce estándar de expresión basal para los citocromos P450.

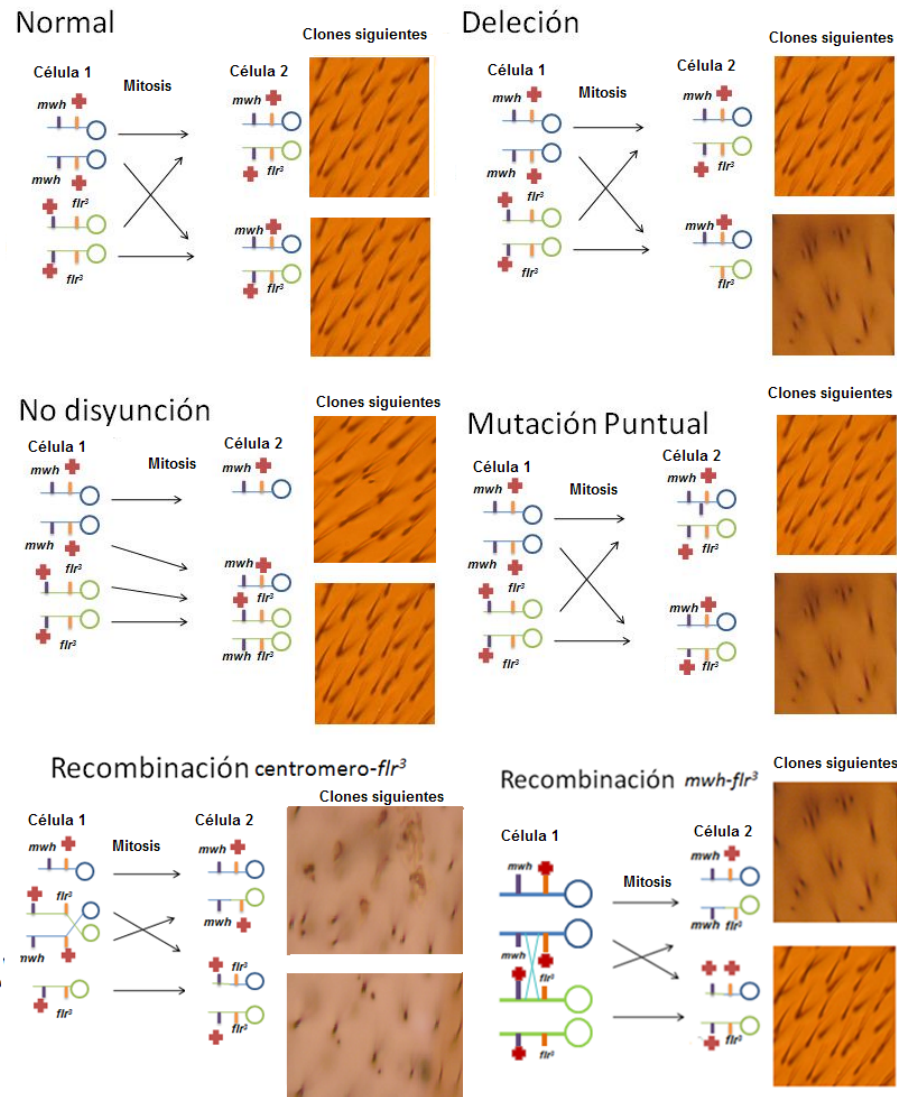


Fig. 9. Eventos genéticos detectados por el ensayo SMART (tomado de Graf et al., 1984).

Las ventajas de este ensayo, entre otras, se refieren a su eficiente sensibilidad, debido a la presencia en el organismo modelo de un paquete de metabolismo enzimático semejante al del ser humano (citocromos p450 y enzimas glutatión-S-transferasas, similares a las fracciones S-9 del hígado en mamíferos) que permiten evaluar los procesos de biotransformación que ocurren a las sustancias



(Barr *et al.*,1980; Kulkarni y Hodgson.,1980: Borrás *et al.*,2003; Vázquez, 2008; Chung *et al.*,2009:).

## **7. JUSTIFICACIÓN.**

La utilización de las plantas por el hombre es muy amplia e incluye diferentes usos. La riqueza vegetal en México ha permitido su extenso aprovechamiento para numerosos fines como la alimentación, decoración, construcción y medicina entre otros. *Poliomintha longiflora* es una planta nativa de Norteamérica que tradicionalmente se usa en varios rubros, en la alimentación como orégano para brindarle un sabor más apetitoso a los alimentos y favorecer la digestión, en la medicina tradicional para tratar malestares respiratorios, musculares y digestivos. Otras cualidades que se le suman es la capacidad antimicrobiana y antifúngica. Sin embargo, son muy pocos los estudios hasta ahora realizados para conocer las implicaciones de su uso en los seres vivos, por lo que resulta interesante realizar pruebas de toxicidad y genotoxicidad, así como el análisis químico cualitativo de los metabolitos secundarios de la planta.

## **8. OBJETIVO GENERAL.**

Determinar si los extractos acuosos de *Poliomintha longiflora* tienen un efecto genotóxico en el ensayo *in vivo* de Mutación Somática y Recombinación Mitótica (SMART) en *Drosophila melanogaster* modalidad ala.

### **8.1. OBJETIVOS PARTICULARES.**

- Valorar la sobrevivencia en larvas de  $72 \pm 3$  horas de edad de *Drosophila melanogaster* expuestas a extractos acuosos de *Poliomintha longiflora*.
- Evaluar la genotoxicidad de los extractos acuosos en larvas de  $72 \pm 3$  horas de edad de *Drosophila melanogaster* expuestas a extractos acuosos de *Poliomintha longiflora*.
- Identificar cualitativamente la presencia de algunos metabolitos secundarios presentes en *Poliomintha longiflora*.

## **9. HIPÓTESIS.**

Si los extractos acuosos de *Poliomintha longiflora* probados en las diferentes concentraciones en el ensayo de SMART en larvas de 72 horas disminuyen significativamente la sobrevivencia de la  $F_1$  y/o inducen un incremento significativo en la frecuencia de manchas totales con respecto al testigo concurrente, entonces se puede afirmar que *Poliomintha longiflora* es tóxica y/o genotóxica.

## **10. MATERIAL Y MÉTODOS.**

### **10.1. POBLACIÓN DE ESTUDIO.**

Muestra de *Poliomintha longiflora*.

La planta utilizada en este trabajo fue colectada en la comunidad de Santiago Anaya en el estado de Hidalgo, México, por Robert Bye y Edelmira Linares, el 6 de Abril 2008, con el número de colecta: R. Bye 35897 y E. Linares.

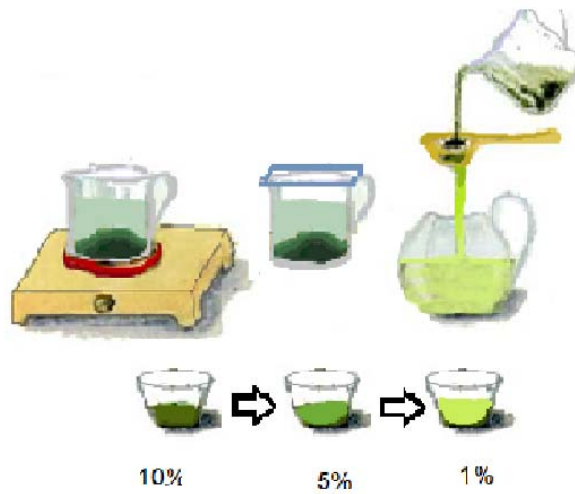
### **10.2. EXTRACTOS ACUOSOS.**

Las plantas medicinales se pueden preparar de diferentes formas dependiendo de la enfermedad que se quiera tratar y las características de la planta. Para conservar su carácter medicinal y mantener su efectividad es importante la manera en la que se prepara. Una de las formas tradicionales en la que se consume *Poliomintha longiflora*, es bebido como agua de uso; por lo que se prepararon los extractos de acuerdo al procedimiento tradicional.

Para la infusión\* se trituraron 10 gramos de la planta seca, se colocaron en un vaso de precipitado y se agregaron 100 mL de agua potable y se dejó al fuego, al llegar al punto de ebullición, la mezcla se retiró del fuego y se tapó, se dejó enfriar y se filtró, obteniendo así la infusión al 10%. A partir de ésta, se realizaron las diluciones para los extractos al 5% y 1% (Figura 10).

---

\*Nota: La forma de preparación de una infusión en la literatura consiste en agregar agua previamente caliente al material vegetal, omitiendo el contacto directo de la planta con el fuego, sin embargo, la forma más común en la que la gente prepara el agua de uso "té" al menos para este caso, es el descrito en la metodología. Sin embargo hay que hacer notar que este procedimiento es el propio de una decocción de corto tiempo. (Flórez *et al.*, 2003)



**Fig. 10. Preparación de las infusiones (decocciones de corto tiempo) al 10%, 5% y 1% de *Poliomintha longiflora*.**

Para preparar la decocción, se utilizaron 4 gramos de las hojas de la planta triturada colocados en 40 mL de agua potable, la mezcla se dejó hervir por 72 segundos, se retiró del fuego, se tapó dejando enfriar y se filtró la decocción quedando a una concentración al 10 % (Figura 10).



**Fig. 11. Preparación de la decocción al 10% de *Poliomintha longiflora*.**

### 10.3. ENSAYOS DE TOXICIDAD Y GENOTOXICIDAD.

#### 10.3.1 CEPAS UTILIZADAS.

Para obtener los organismos con los que se trabajó en la prueba de toxicidad y en el ensayo SMART se utilizaron dos cepas de *Drosophila melanogaster* estas son:

La cepa ***flr<sup>3</sup>*** (*flr<sup>3</sup>/ln(3LR) TM3,ri p<sup>o</sup> sep I(3)89Aa bx<sup>34</sup> e Bd<sup>s</sup>*) que contiene el marcador “flare” (flama) con localización 3-38.8 el cual es una mutación recesiva que se expresa en los tricomas de las alas en forma de flama, se caracteriza porque en condición homocigota es letal, por lo que en la cepa usada tiene incorporado un cromosoma balanceador ***TM3*** (que por su constitución contiene múltiples inversiones). La principal función del cromosoma balanceador ***TM3*** es evitar la recombinación con su cromosoma homólogo, permitiendo la viabilidad de los organismos. En este cromosoma también se encuentran otras mutaciones: como ***Bd<sup>s</sup>*** que se expresa en los adultos con bordes aserrados en las alas, lo que permite identificar cuales individuos poseen el cromosoma balanceador y al mismo tiempo ***flr<sup>3</sup>***. En estado homocigoto ***Bd<sup>s</sup>*** es letal.

- La cepa ***mwh e***, (*mwh e/mwh e*) contiene 2 marcadores recesivos, uno es “ebony” (***e***), localizado en el cromosoma 3 (3-70.7), la presencia de esta mutación facilita la identificación de los tipos de progenie que se obtienen en el ensayo, ésta se expresa con un color negro (ébano) en el cuerpo de los adultos. El segundo marcador es ***mwh*** (“múltiple wing hairs” localización 3-0.3) que se

expresa en condición homocigota como más de un tricoma (de 2 a 7) por célula en las alas.

La progenie de la cruce hembras vírgenes *flr<sup>3</sup>/In(3LR) TM3,ri p<sup>p</sup> sep I(3)89Aa bx<sup>34</sup> e Bd<sup>s</sup>* y machos (*mwh e/mwh e*) fue utilizada para el ensayo de toxicidad y para el ensayo SMART.

Los fenotipos observados en las alas de la progenie F<sub>1</sub> pueden ser dos tipos de acuerdo a la constitución genética: los trans-heterocigotos (*mwh e +/ + + flr<sup>3</sup>*), fenotipo silvestre y las cis-heterocigotas (*mwh e +/ TM3 e Bd<sup>s</sup>*), fenotipo serratia con el borde de las alas aserradas y color del cuerpo ébano.

### **10. 3.2 ENSAYO DE TOXICIDAD.**

Para la prueba de toxicidad se expuso a larvas de 72 ± 3 horas de edad procedentes de la cruce hembras *flr<sup>3</sup>/ TM3* con machos *mwh e /mwh e* a tratamientos crónicos de los extractos acuosos, evaluando al final la sobrevivencia en adultos. A continuación se explica la metodología.

**Cruza.-** Se cruzaron 70 hembras vírgenes *flr<sup>3</sup> /TM3* con 30 machos *mwh e/mwh e* por frasco.

**Sincronización.-** Tres días después de realizar la cruce se trasvasó a los progenitores a medio de cultivo fresco, con una gota de levadura para pan (para estimular la ovoposición). Transcurridas 6 horas (período de sincronización) se retiró cuidadosamente a los progenitores del frasco.

**Obtención de las larvas.-** 72 horas después se recolectaron las larvas, de acuerdo al método Nöthiger (con disolución acuosa de sacarosa al 20%). Las larvas colectadas, fueron contadas al microscopio estereoscópico. Agrupadas en un número de 50 individuos.

**Tratamiento crónico (48 horas).-** Se prepararon 5 viales, cada uno contenía 0.5 gramos de medio instantáneo (Carolina Biological Supply Company, Burlington, NC) y 3.5 mL de extractos acuosos de *Poliomintha longiflora* que en este caso fueron infusión 10%, 5% y 1% y decocción 10% además se utilizó un testigo negativo, el disolvente (agua). La exposición de las larvas al tratamiento fue de tipo crónico de 48 horas, que se continuó hasta que emergió el adulto. El experimento se realizó por duplicado.

**Fijación de Adultos.-** Entre 10 y 12 días después de que emergieron los adultos fueron transferidos a tubos de plástico con etanol al 70 % para su conservación.

**Análisis de Supervivencia.-** Contados y clasificados de acuerdo al sexo y fenotipo de las alas, fue determinando el porcentaje de supervivencia en cada concentración probada.

### **10.3.3 ENSAYO DE MUTACIÓN SOMÁTICA Y RECOMBINACIÓN MITÓTICA (SMART).**

Para el ensayo SMART se expuso a larvas de  $72 \pm 3$  horas de edad provenientes de la cruce hembras *flr<sup>3</sup> /TM3* con machos *mwh e/mwh e* a tratamientos crónicos de los extractos acuosos.

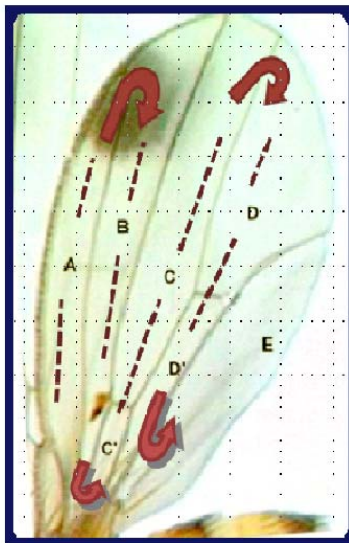
Al igual que para el ensayo de toxicidad, se estableció la crucea ***flr<sup>3</sup>/TM3*** x ***mwh e/mwh e*** y se sincronizaron, se obtuvieron larvas de la crucea de  $72 \pm 3$  horas edad, que se expusieron a tratamientos crónicos, se continuó el desarrollo de los organismos hasta la emergencia del adulto y se fijaron estos en etanol al 70 % por fenotipo del ala y sexo y por separado fueron guardados en tubos de plástico. A continuación se elaboraron las preparaciones.

**Elaboración de preparaciones de alas.** Las alas de los adultos transheterocigotos ***mwh +/+ flr<sup>3</sup>*** con fenotipo silvestre fueron utilizadas y se realizaron 3 preparaciones para cada concentración. Para cada preparación se utilizaron 20 pares de alas (10 hembras y 10 machos), con ayuda de finas pinzas de reloj se desprendieron del cuerpo sin romperlas, se colocaron en un portaobjetos de vidrio con ayuda de la disolución Faure acomodadas en 4 filas de 5 columnas, las 2 primeras filas corresponden a las alas de las hebras (1- 20) y las últimas filas a las alas de machos (21-40) (Figura12). Se dejó secar la preparación por 4 días, al cabo de los cuales se les colocó un cubreobjetos con una gota de Faure y se prensó por otros 4 días. Al finalizar este tiempo se sellaron los bordes con barniz para uñas transparente. Se continuó con el análisis al microscopio.

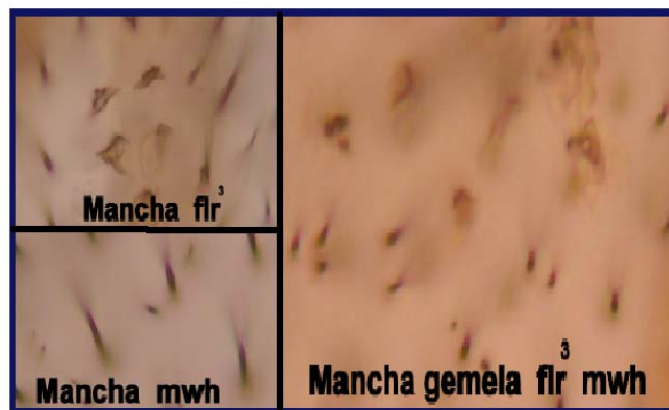




**Análisis de las preparaciones de alas.-** Las preparaciones fueron codificadas por una persona ajena al estudio para evitar influenciar los resultados. El análisis de las manchas se realizó en un microscopio óptico a un aumento de 40X (Figura 13), se registró el tipo, tamaño y ubicación de las manchas (Figura 14).



**Fig. 13. Orden en que se leen las alas (de la sección A a la E).**



**Fig. 14 . Clasificación de tipo de manchas.**

**Análisis Estadístico del ensayo SMART.**-Los datos de las lecturas se procesaron con el programa computacional SMART (Frei y Würigler,1988) que analiza:

**Tipo de manchas.**- Es el indicador de eventos genéticos terminales diferentes, es decir, las manchas simples son producto de deleciones, mutaciones puntuales, no disyunción y recombinación entre los dos marcadores (*mwh* y *flr<sup>3</sup>*). Mientras que las manchas gemelas son producto de la recombinación entre *flr<sup>3</sup>* y el centrómero.

**Tamaño de las manchas.**- Indica el tiempo en que se indujo la formación del clon mutante. Sí ocurre en una etapa temprana del desarrollo se recobran manchas grandes, pero si ocurre al final del desarrollo producirá manchas chicas las cuales se han asociado con la biotransformación del compuesto por las larvas. También nos puede indicar aneuploidia en la célula.

**Número y frecuencia de manchas totales.**- Indica la frecuencia de manchas totales inducidas en cada concentración.

**Promedio de ciclos de división celular.**- Indica el número de divisiones celulares que ocurrieron

**Frecuencia de formación de clones x 10<sup>-5</sup>.**- Estima cuántos clones se inducen con base a un número constante de células. El programa estadístico SMART hace comparaciones, de acuerdo a los registros, de las frecuencias observadas para los tratamientos respecto al testigo concurrente. La conclusión del análisis se basa en 2 hipótesis:

**H0:1** La frecuencia de manchas en moscas tratadas no es mayor  $m$  veces a la frecuencia de mutación en el testigo concurrente.

**Ha:2** La frecuencia de manchas en las moscas tratadas es mayor  $m$  veces a la frecuencia de manchas observada en el testigo concurrente.

Donde  $m$  es el factor de multiplicación que indica el número por el que se multiplica para considerar un efecto genotóxico con respecto al control.

Siendo  $m= 2$  para el total de las manchas y para las manchas simples y  $m= 5$  para las manchas gemelas y para manchas grandes.

Pudiendo resultar cuatro decisiones:

- ❖ Aceptar la primera hipótesis. Resultado negativo, es decir el compuesto no se considera genotóxico.
- ❖ Aceptar la segunda hipótesis. Resultado positivo, es decir el compuesto se considera genotóxico.
- ❖ Aceptar ambas hipótesis. Ya que las dos respuestas no pueden ser ciertas al mismo tiempo se considera un resultado inconcluso.
- ❖ Rechazar ambas hipótesis. Se considera como débil positivo.

**Tabla 4. Posibles respuestas emitidas por el programa SMART**

**(tomado de Frei y Würigler,1988).**

	Aceptando HO:1	Rechazando HO:1
Aceptando Ha:2	No concluyente (i)	Positivo(+)
Rechazando Ha:2	Negativo(-)	Débil positivo(w)

#### **10.4. DETECCIÓN DE GRUPOS QUÍMICOS DE METABOLITOS SECUNDARIOS.**

Para la detección cualitativa de los principales metabolitos secundarios presentes en *Poliomintha longiflora*, se trabajó en colaboración con el personal del laboratorio de Fitoquímica de la Facultad de Ciencias.

Para obtener los metabolitos secundarios de la planta se prepararon tres extractos de *Poliomintha longiflora* por maceración sucesiva con disolventes de distinta polaridad: hexano, acetato de etilo y metanol, se usaron en ese orden con el fin de separar los componentes afines y solubles en el respectivo disolvente y obtener mezclas menos complejas.

Para obtener el primer extracto, se hizo una mezcla con 50 gramos de la planta molida y aproximadamente 250 mL de hexano, se dejó reposar por 24 horas en oscuridad con agitación constante, transcurrido el tiempo se filtró la mezcla, y el

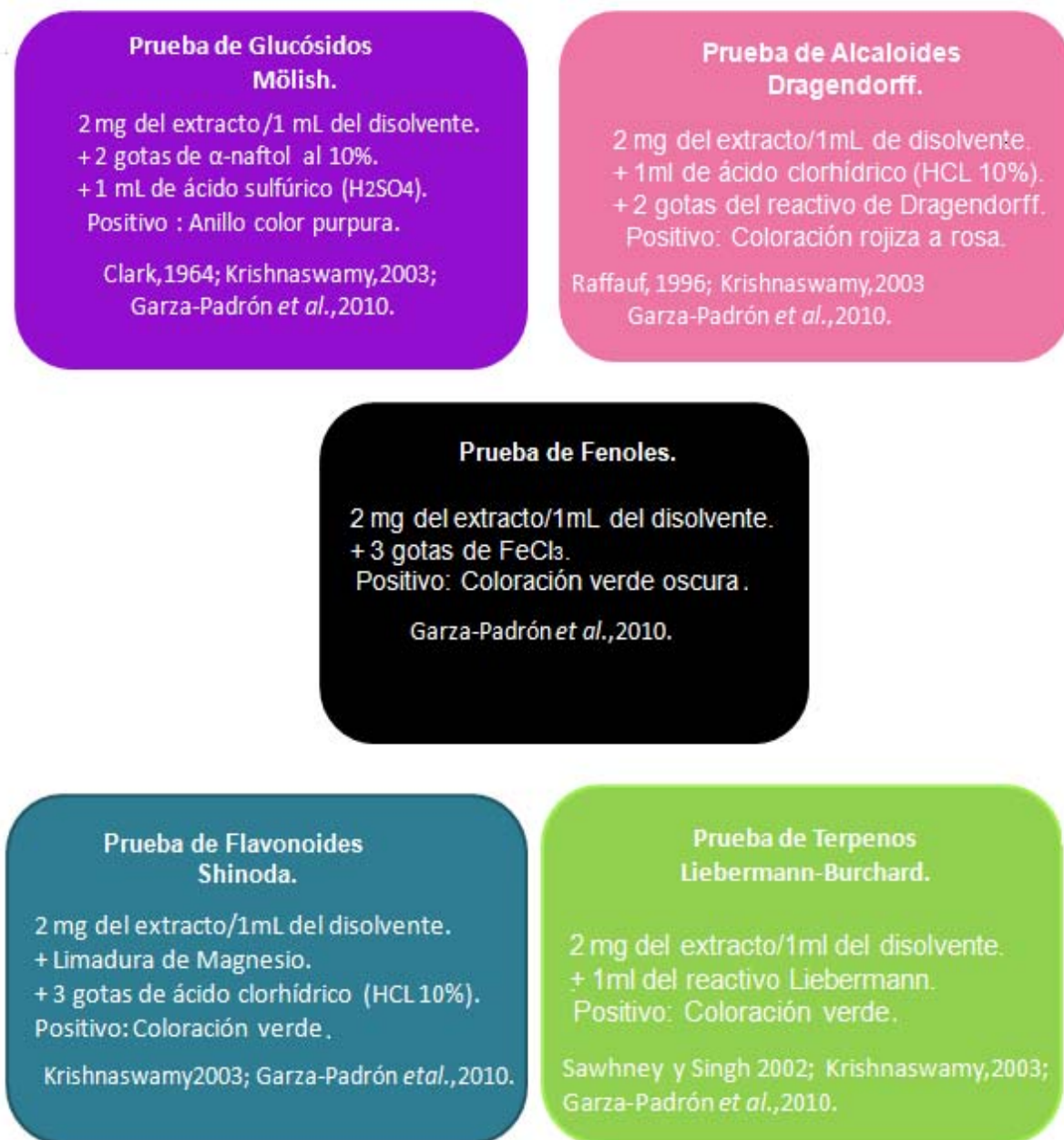
filtrado se destiló a presión reducida en un rotaevaporador (marca BÜCHI modelo R-205). El extracto obtenido se colectó con un mínimo de disolvente y se depositó en un frasco. El procedimiento se repitió en tres ocasiones. Una vez terminada la extracción con hexano se continuó con el mismo procedimiento con los demás disolventes (acetato de etilo y metanol), secando el material vegetal antes de cambiar al siguiente disolvente. Obtenidos los tres extractos se secaron al aire libre en campana de extracción para evaporar los residuos de disolventes.

Se realizó también la determinación cualitativa de metabolitos secundarios en los extractos orgánicos y acuosos al 10% de *Poliomintha longiflora*. Para las pruebas con extractos acuosos se prepararon 50 mL de la solución de infusión al 10 % y 50 mL de la decocción al 10% de acuerdo al procedimiento indicado previamente. Los extractos acuosos se congelaron y liofilizaron (procedimiento por el cual se elimina el disolvente). La eliminación del agua es necesaria para algunas reacciones de las pruebas coloridas que se realizaron después.

Las pruebas aplicadas para todos los extractos orgánicos y acuosos fueron:

- Prueba de Mölisch para detectar presencia de glucósidos.
- Prueba de Dragendorff para detectar presencia de alcaloides.
- Prueba de  $\text{FeCl}_3$  para detectar presencia de fenoles.
- Prueba de Shinoda para detección de flavonoides.
- Prueba de Liebermann- Burchard para detectar terpenos.

El procedimiento seguido para las cinco pruebas se resume en la Figura 14.



**Fig. 14. Metodología para las pruebas cualitativas de metabolitos secundarios.**

## 11. RESULTADOS.

### 11.1 ENSAYOS DE TOXICIDAD Y GENOTOXICIDAD.

Para estas pruebas, se utilizaron las mismas cepas de *Drosophila melanogaster*, *flr<sup>3</sup>/TM3* y *mwh e*. De acuerdo a la metodología ya descrita (Figura 18).



Fig.18. Ensayo de toxicidad y ensayo SMART.

Nota:

\*Para el ensayo de toxicidad se analizó la sobrevivencia, se cuantificó el número de adultos.

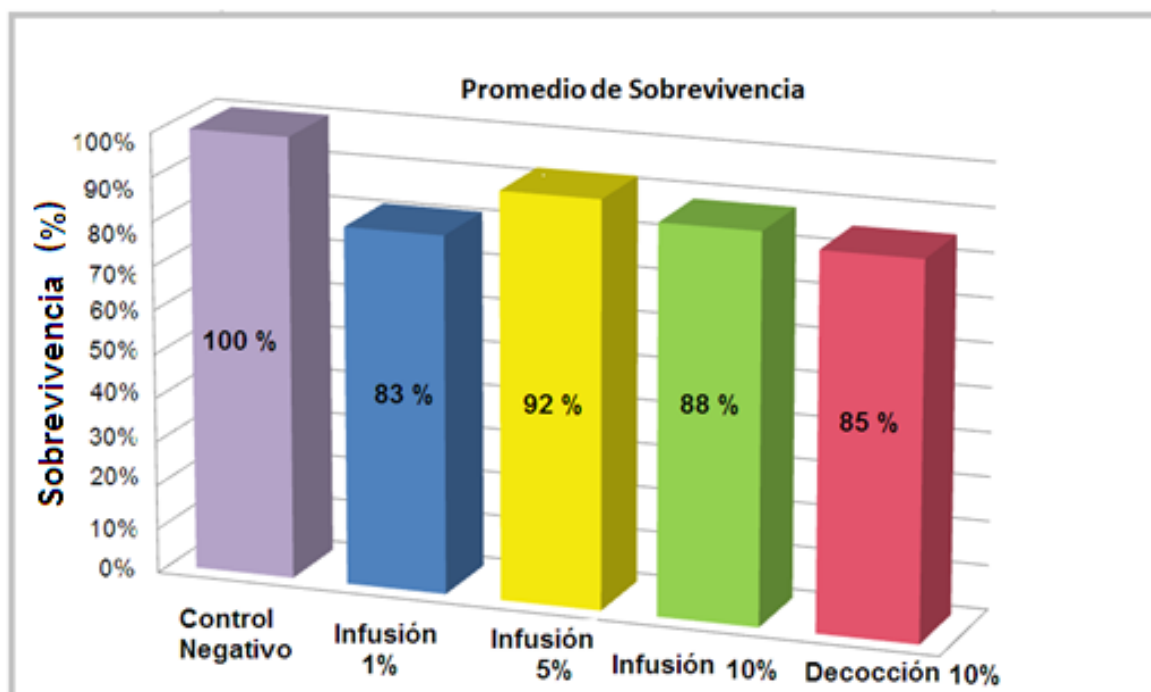
\*Para el ensayo SMART se cuantificó la frecuencia de manchas de las alas de los adultos.

### **11.2.1 ENSAYOS DE TOXICIDAD.**

La dosis letal (LD<sub>50</sub>) es la concentración en la cual se mueren el 50% de los individuos de una población. En los experimentos para toxicidad con los extractos acuosos de *Poliomintha longiflora* en modalidades y concentraciones de: infusión 1%, 5%, 10% y decocción 10%, se determinó el porcentaje de sobrevivencia en etapa adulta de las larvas expuestas a un tratamiento crónico de 48 horas con respecto al testigo concurrente. El experimento se realizó por duplicado.

Los resultados promedio muestran una sobrevivencia superior al 80% para los adultos tratados en etapa larvaria con cada uno de los extractos, haciendo notar que la dosis letal media para *Drosophila melanogaster* bajo las condiciones probadas, debe ser superior a una concentración al 10%, lo que permite someter a las larvas a las dosis probadas para el ensayo SMART teniendo evidencia de que aún en la concentración máxima de 10 % sobrevivirán al ensayo la cantidad suficiente de individuos para realizar el análisis. Las concentraciones de 1%, 5% y 10%, son semejantes a las formas de consumo humano.





Gráfica 1. Porcentaje de supervivencia en el ensayo de toxicidad en larvas de *Drosophila melanogaster*.

### 11.2.2 ENSAYO SMART.

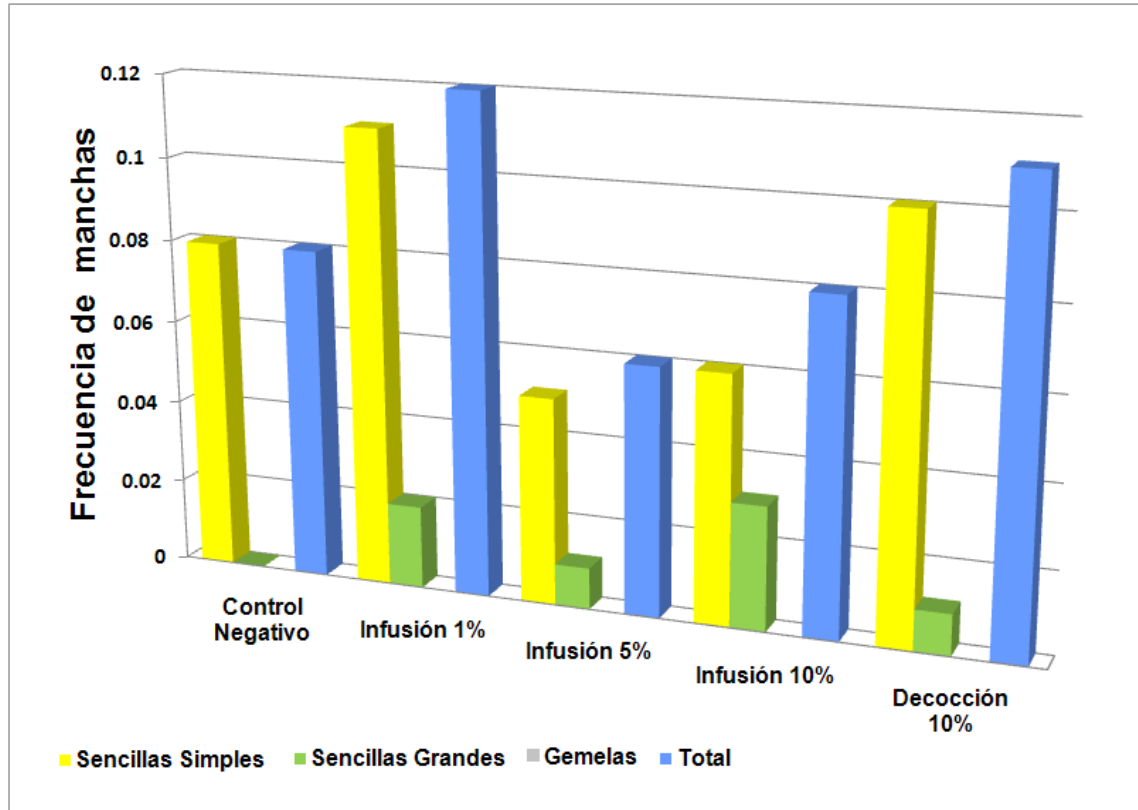
En el ensayo de genotoxicidad de Mutación Somática y Recombinación Mitótica en larvas de 72 horas, la frecuencia de manchas totales de las diferentes concentraciones con respecto al control mostró que no hay un incremento significativo con respecto al testigo (Tabla 7).

Tabla 7 Ensayo de Mutación Somática y Recombinación Mitótica en alas de <i>Drosophila melanogaster</i> .									
Concentraciones	No. De alas	Manchas pequeñas simples (1-2 cel) m=2.00	Manchas grandes simples (> 2 cel) m=5.00	Manchas Gemelas m=5.00	Manchas Totales m=2.00	Clones con manchas <i>mwh</i>	Promedio de ciclos de división celular	Frecuencia de Formación de clones x10 <sup>(-5)</sup>	
		Observadas	Corregidas						
Control Agua	120	0.08 (10)	0.00 (0)	0.00 (0)	0.08 (10)	10	1	0.3	
Infusión 1%	120	0.11 (13)i	0.02 (2)i	0.00 (0)-	0.12 (15)i	15	1.53	0.5	0.2
Infusión 5%	120	0.05 (6)-	0.01 (1)-	0.00 (0)-	0.06 (7)-	7	1.71	0.2	-0.1
Infusión 10%	120	0.06 (7)-	0.03 (3)-	0.00 (0)-	0.08 (10)-	10	1.9	0.3	0
Decocción 10%	120	0.10 (12)-	0.01 (1)-	0.00 (0)-	0.11 (13)-	13	1.3	0.4	0.1

(+) Positivo (-) Negativo (W) Débil positivo (i) Inconcluso (m) Factor de multiplicación

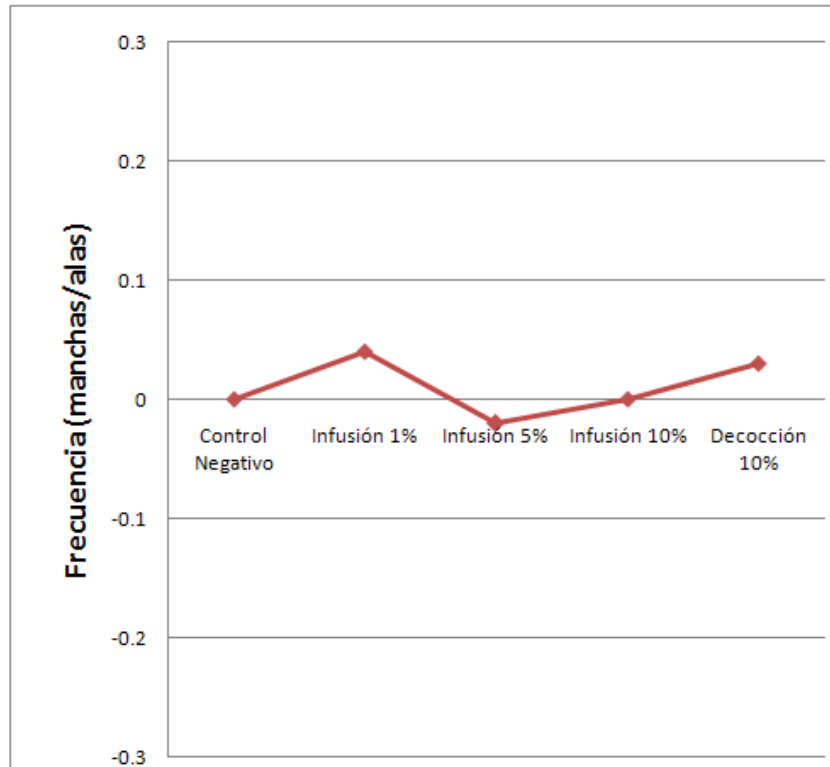
Diagnóstico estadístico de acuerdo con Frei y Würigler (Mutation Res., 203 (1988) 207-308) Programa PC Versión 2.1

Sin embargo, para el tipo de manchas (Gráfica 2), se encontraron manchas pequeñas simples *mwh* y una ausencia de manchas gemelas.



**Gráfica 2. Tipos de manchas en el ensayo SMART modalidad ala.**

La frecuencia de manchas en los tratamientos es baja y no supera el doble de la frecuencia de manchas en el testigo concurrente (Gráfica 3). Asimismo la frecuencia de formación de clones es menor a dos



Gráfica 3. Frecuencia total de manchas corregida en los extractos acuosos de *Poliominta longiflora*.

Esto nos indica que el incremento en las frecuencias de inducción de manchas de los tratamientos respecto al testigo no es significativo.

### 11.3. DETECCIÓN DE GRUPOS QUÍMICOS DE METABOLITOS SECUNDARIOS

Los componentes de las plantas nos pueden dar indicios del efecto que producen en los organismos. Los principios activos son los responsables de los resultados que consideramos nocivos o benéficos y en su gran mayoría son los metabolitos secundarios los responsables directos, muchos de éstos se siguen estudiando, por ejemplo, se sabe que la presencia de glucósidos en plantas se asocia a propiedades diuréticas, balsámicas y antirreumáticas; los fenoles que protegen a

las plantas del daño por oxidación y realizan la misma función en los seres humanos, algunos flavonoides indican tener capacidades antioxidantes, antiinflamatorias antiespasmódicas, de inducción enzimática, de desintoxicación, de crecimiento celular, antifúngicas, bactericida, antialérgica, antimutagénicos, anticarcinogénicos y antiviral; los terpenos son considerados los responsables de aroma penetrante y particular de algunas plantas aromáticas; y los alcaloides se asocian a la protección de los vegetales por lo que pueden resultar tóxicos a bajas concentraciones (Zheng y Wang,2001; Martínez-Flores *et al.*,2002; Astidillo-Vázquez *et al.*, 2009).

A partir de 50 gramos de *Poliomintha longiflora*, se 3 obtuvieron por maceración sucesiva extractos con disolventes de diferente polaridad, de cada extracto se determinó el rendimiento notándose un rendimiento superior en el extracto obtenido con metanol. En el caso de los extractos acuosos, se notó un rendimiento superior en la modalidad infusión (Tabla 5).

**Tabla 5. Rendimiento de los extractos.**

<b>Extractos orgánicos</b>	
<b>Extracto</b>	<b>%</b>
Hexano	2.98
Acetato de etilo	1.96
Metanol	19.62

Extractos acuosos	
Extracto	%
Infusión 10%	39.4
Decocción 10%	1.5

En el extracto hexánico se determinó la presencia de terpenos (Figura 15).

#### Extracto de hexano



**Terpenos** **Flavonoides** **Fenoles** **Alcaloides** **Glucósidos**

■ Negativo ■ Positivo

Fig. 15. Resultados de las pruebas coloridas y de precipitación para detectar metabolitos secundarios en el extracto de hexano de *Poliomintha longiflora*.

El extracto de acetato de etilo mostró la presencia de fenoles, flavonoides y terpenos con intensa coloración (Figura 16).

#### Extracto de acetato de etilo

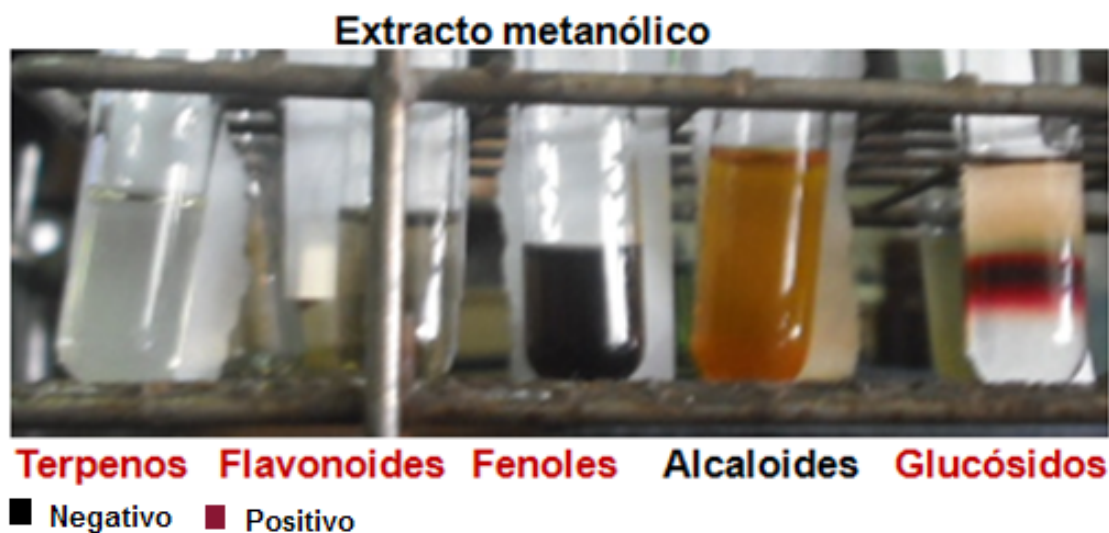


**Terpenos** **Flavonoides** **Fenoles** **Alcaloides** **Glucósidos**

■ Negativo ■ Positivo

Fig.16. Resultado de las pruebas coloridas y de precipitación para detectar metabolitos secundarios en extracto de acetato de etilo de *Poliomintha longiflora*.

El extracto metanólico dio resultados positivos para la presencia de terpenos, fenoles, flavonoides y glucósidos, reportando por su intensidad de coloración que hay gran presencia de fenoles y flavonoides (Figura 17).



**Fig. 17. Resultados de las pruebas coloridas y de precipitación para detectar metabolitos secundarios en el extracto de metanol de *Polimintha longiflora*.**

Los resultados de las pruebas en *Poliomintha longiflora* en los extractos orgánicos indican presencia de fenoles, flavonoides, terpenos y glucósidos. Los terpenos se encontraron en todos los extractos con mayor abundancia en el extracto de acetato de etilo. Los fenoles y flavonoides se detectaron en dos de los tres extractos y por último los glucósidos sólo se encontraron en el extracto metanólico. Los resultados de las pruebas coloridas y de precipitación en los extractos acuosos muestran detección de fenoles y terpenos en la infusión al 10%. En la decocción al 10% se detectaron fenoles, flavonoides y terpenos (Tabla 6).

**TABLA 6. Grupos químicos de metabolitos secundarios detectados en extractos orgánicos y acuosos de *Poliomintha longiflora*.**

	<i>Extractos orgánicos</i>			<i>Extractos acuosos</i>	
	<i>Hexano</i>	<i>Acetato de Etilo</i>	<i>Metanol</i>	Infusión 10%	Decocción 10%
<i>Glucósidos</i>	-	-	+	-	-
<i>Alcaloides</i>	-	-	-	-	-
<i>Fenoles</i>	-	+	++	+	+
<i>Flavonoides</i>	-	+	++	.	+
<i>Terpenos</i>	++	+++	+	+	++
<p>- <i>Sin detectar</i></p> <p>+ <i>Detectado</i></p> <p><i>Abundancia (por comparación cualitativa) + Baja ++Moderada +++Abundante</i></p>					



## 12. DISCUSIÓN

Las hierbas se han utilizado para una amplia gama de propósitos incluyendo la medicina, hoy en día al menos el 80 % de la población de países en desarrollo han hecho o hacen uso de la medicina tradicional para tratar padecimientos de la salud (Organización Mundial de la Salud, 2004). Debido a su accesibilidad y a la importancia cultural, muchos mexicanos prefieren la medicina herbolaria a la alopática y su uso frecuentemente se da sin cuestionarse un verdadero beneficio e incluso ignorando un probable riesgo (Jorand, 2008). Son pocos, aunque cada día más, los estudios farmacológicos que se han hecho para validar de forma fundamentada el uso de plantas medicinales (Orozco, 2004). Para determinar que la seguridad de uso de una planta medicinal es la suficiente para el consumo humano, se requiere de una gran cantidad de pruebas (Remigio *et al.*, 2001). Entre los estudios que destacan se encuentran: el análisis de componentes fitoquímicos, ensayos tóxicos y genotóxicos con pruebas *in vivo* e *in vitro*, pruebas clínicas a distintas concentraciones y evaluaciones de los efectos a corto, mediano y largo plazo. Una vez hechos todos los estudios necesarios y comprobados los beneficios, es posible crear medicamentos herbolarios<sup>1</sup> o incluso alopáticos.

---

1-Los medicamentos herbolarios son productos derivados de remedios herbolarios a los que se añadió la aplicación de la ciencia experimental: farmacología, fotoquímica, requerimientos del cultivo, estandarización de dosis y evaluación clínica en pacientes (Castellanos, 2009).

Las pruebas *in vitro* e *in vivo* suelen ser muy útiles y necesarios para la evaluación de toxicidad y genotoxicidad, pues cada una proporciona información del mecanismo de acción del agente (Lauwerys, 1994). Las pruebas de toxicidad se enfocan a evaluar el grado de afectación de una sustancia en los organismos. Aplicadas a la toxicología genética tratan de evaluar la capacidad de los agentes de inducir cualquiera de los tres tipos generales de mutaciones que puede sufrir el material genético: cambios génicos, cromosómicos y genómicos (Silbergeld *et al*., 1998). En este contexto el bioensayo *in vivo* SMART en *Drosophila melanogaster* modalidad ala, se utiliza para evaluar los efectos genotóxicos (mutaciones puntuales, deleciones, recombinación mitótica y no disyunción) de sustancias ya sean mezclas simples o compuestos, en células somáticas (Frei y Graf -datos inéditos-).

En este trabajo se empleó a *Drosophila melanogaster* por las múltiples ventajas que ofrece como modelo *in vivo* para determinar la toxicidad y la genotoxicidad de los extractos acuosos de la planta *Poliomintha longiflora*.

Respecto a la toxicidad es importante hacer referencia a un estudio anterior, en el que se determinó un efecto tóxico. Por el ensayo de Lorke en ratas se determinó la LD<sub>50</sub> <2.3 mg/kg y en la prueba de sobrevivencia de *Artemia salina* una CD<sub>50</sub> 169.04 µg/mL para extractos orgánicos de *Poliomintha longiflora* (Déciga-Campos *et al.*, 2007). Sin embargo en el presente estudio se realizaron ensayos de toxicidad con disoluciones acuosas: infusión al 10%, 5%, 1% y decocción al 10% en larvas de *Drosophila melanogaster* de 72 ± 3 horas de edad, en estos tratamientos no se encontró un efecto tóxico. Estas disoluciones son semejantes a

la forma de consumo tradicional para aliviar dolores estomacales (agua de uso) en las que se utiliza un puñado de hojas secas en un litro de agua, es importante indicar que en la concentración de 1% de *Poliomintha longiflora* corresponde a la concentración de referencia de las bolsa de té comercial.

Posiblemente la diferencia de respuesta obtenida por Déciga-Campos *et al.*, 2007 con respecto a la toxicidad puede deberse: (i) A pesar de ser la misma especie las colectas fueron de diferentes estados, la del estudio de Déciga-Campos provienen del estado de San Luis Potosí en noviembre del año 2005 mientras que las colectas de este trabajo son del estado de Hidalgo en el año 2008. Se ha reportado que los componentes de las plantas pueden variar de acuerdo a las condiciones ambientales de las zonas en las que crecen los organismos (Cases,2007). Por lo que alguna variación en los compuestos podría ser la causa de la diferencia. (ii) La elaboración. En este trabajo se usaron extractos acuosos al 10% 5% y 1%, mientras que el trabajo de Déciga-Campos se usaron extractos orgánicos obtenidos por maceración con una mezcla de disolventes metanol-diclorometano (1:1) usadas en dosis de 10,100, 1000mg/kg en el ensayo de Lorke y de 10,100, 1000 µg/ml en el ensayo de *Artemia salina*.

Con respecto a la genotoxicidad, el tipo de manchas registradas en los tratamientos son manchas *mwh* que pueden representar un evento de mutación puntual, no disyunción y recombinación entre los dos marcadores, sin embargo, al comparar con el testigo negativo concurrente la respuesta en la inducción de la frecuencia de manchas no fue estadísticamente significativa. El tamaño de las

manchas obtenidas fueron en su mayoría pequeñas, lo que en caso de haber resultado genotóxica *Poliomintha longiflora* para este ensayo, se podría pensar en un daño de la mezcla asociada con el proceso de biotransformación, ya que no hubo diferencias significativas con el testigo concurrente las manchas obtenidas pueden asociarse daños basales. Los resultados de la prueba estadística hace notar que no hay un incremento significativo que indique genotoxicidad en los extractos acuosos de *Poliomintha longiflora* bajo las condiciones probadas. Lo cual concuerda con un trabajo donde se realizó el ensayo de Ames para genotoxicidad(Déciga-Campos *et al.*,2007).

En cuanto a los metabolitos secundarios se encontró la presencia de glucósidos, fenoles, flavonoides y terpenos. Aranda y colaboradores en el 2009, reportan los siguientes componentes de *Poliomintha longiflora* (Tabla 8).

Tabla 8. Compuestos reportados para *Poliomintha longiflora* (Aranda *et al*, 2009).

Compuesto	Grupo	Usos y ensayos.
1-Alpha-pineno	Monoterpeno	Utilizado en la manufactura de insecticidas y perfumes. LD <sub>50</sub> en rata en concentraciones de 3700 mg/kg. Puede causar irritación en piel.
1-octen, 3-ol	Alcohol secundario	Su uso esta aceptado en alimentos, cosméticos, también se usa combinado con otros compuestos para matar plagas de insectos De baja toxicidad LD <sub>50</sub> en ratas de 340 mg/kg.
Beta-mirceno	Monoterpeno	Usado en la industria de la perfumería y de los alimentos, se desarrollan pruebas para usarlo como analgésico. Tiene efectos tóxicos y es inductor enzimático para el metabolismo de xenobióticos.

Cimeno	Monoterpeno	Se ha utilizado como analgésico tópico local para el alivio del dolor en procesos reumáticos.
(+)-4 Careno	Monoterpeno	Utilizado en la elaboración de perfumes, con una LD <sub>50</sub> en ratas de 4800 mg/kg.
Borneol	Sesquiterpeno	Se utiliza en síntesis orgánica para esteres y productos farmacéuticos para enfermedades. pulmonares inflamación, llagas, infecciones, forunculosis, dolor y enfermedades de los ojos, fabricación de cosméticos e inciensos, LD <sub>50</sub> determinada en ratas de 4,300 a 6,200 mg/Kg.
Timol	Monoterpeno	Se caracteriza por su poder desinfectante y fungicida, presente en la formulación de diversos enjuagues bucales, pastas de dientes y detergentes, Baja toxicidad, LD <sub>50</sub> en rata de 2 a 980 mg/kg. Negativo para genotoxicidad en el ensayo de Ames.
Carvacrol	Monoterpeno	Inhibe el crecimiento de bacterias, proporciona un sabor y olor agradable, usado como aditivo alimentario, baja toxicidad con LD <sub>50</sub> en ratas 810 mg/Kg.
Cariofileno	Monoterpeno	De actividad antiinflamatoria.

En *Poliomintha longiflora* la mayoría de lo compuestos reportados son terpenos, éstos son empleados por su aroma agradable en la industria de los perfumes y alimenticia, por sus capacidades antimicrobianas, analgésicas, antiinflamatorias (por ejemplo el borneol y el pineno son usados para tratar trastornos digestivos). En este trabajo se utilizaron las hojas de la planta (mezcla ), que de acuerdo a las pruebas colorimétricas se reporta una gran cantidad de terpenos (Fig. 15, 16 y 17) lo que concuerda con componentes que se tienen ya reportados.

### 13.-Conclusiones.

- ❖ Los extractos acuosos de *Poliomintha longiflora* probados no mostraron ser tóxicos.
- ❖ Las concentraciones de infusión 1%, 5% y 10% y decocción 10% no mostraron ser genotóxicos en el ensayo SMART modalidad ala.
- ❖ Los metabolitos secundarios presentes en la muestra analizada de *Poliomintha longiflora* son fenoles, flavonoides, glucósidos y terpenos.

#### Sugerencias.

- ❖ Realizar ensayos que involucren un tratamiento con un mutágeno oxidante y un postratamiento con la planta *Poliomintha longiflora* con la finalidad de evaluar *in vivo* la capacidad antioxidante de la planta, pues los metabolitos reportados en este y otros trabajos con *Poliomintha longiflora* hacen suponer una capacidad antioxidante.

## 14. BIBLIOGRAFÍA.

A

Adams, M. D. *et al.*, (2000). The genome sequence of *Drosophila melanogaster*.

Science, 287(5461):2185-2195.

Alanís-Flores, G. J. (2008). Evaluación de poblaciones de Orégano Nuevo León,

*Poliomintha longiflora* Gray, del norte de Nuevo León. 3° Reunión Nacional sobre el orégano, Saltillo, Coahuila, México.

Ames, B. N., Lee, F. D., Durston, W. E. (1973). An improved bacterial test system

for the detection and classification of mutagens and carcinogens. Proc. Natl.

Acad. Sci.USA., 70(3):782–786.

Amorós, G. M. (2001). Estudio de mutantes del cromosoma III de *Drosophila*

*melanogaster*. el gen *ash-2* como regulador de diferenciación celular. Tesis doctoral, Universidad de Barcelona, España, p 1-10, 16.

Aranda, R. J., Delgado, J. A., Montoya, L., Cisneros, Z. (2005). Evaluación de la

producción de orégano liso (*Poliomintha longiflora* Gray) en dos localidades en el municipio de las Higueras, N.L e identificación de la capacidad productora de aceites esenciales. Revista de la Salud y Nutrición, UANL.

Aranda, R. J., Bautista, M. S., Silva, V. R., González, G. R. (2006). Efecto de los

aceites esenciales del orégano (*Poliomintha longiflora*) colectado en la localidad Infiernillo del municipio de Higueras, Nuevo León, en la

conservación de carne de res. UANL. Congreso internacional 2006  
Inocuidad alimentaria, trabajos en cartel.

Aranda, R.J., González, G. R., García, Z. E. A. (2008). Poblaciones de orégano (*Poliomintha longiflora* a Gray) en la Sierra de picachos municipio de las Higueras, Nuevo León. Tercera reunión nacional sobre el orégano, Revista de la salud y nutrición, UANL edición especial No.1-2008, Saltillo, Coahuila, México.

Aranda, R. J., Silva, V. R., Franco, H. D. I. (2009). Caracterización del aceite esencial de orégano liso (*Poliomintha longiflora* Gray) de la localidad infiernillo en el municipio de Higueras, Nuevo León, México. Revista de la Salud y Nutrición, UANL.

Astidillo–Vázquez., Mata. R., Navarrete. A. (2009). El reino vegetal, fuente natural de antiespasmódicos gastrointestinales y antidiarreicos. Revista. Latinoamericana de Química, p 37-44.

## B

Baars, A. J., Blijleven, W. G., Mohn, G. R., Natarajan, A. T., Breimer, D. D. (1980). Preliminary studies on the ability of *Drosophila* microsomal preparations to activate mutagens and carcinogens. *Mutat. Res.*, 72(2):257-264.

Bate, M y Martínez-Arias, A. (1991). The embryonic origin of imaginal discs in *Drosophila*. *Development*, 112(3):755-761.



- Bayantine, B. (2005). The occupational toxicologist: professionalism, morality and ethical standards in the context of legal and non-litigation issues. *J. Appl. Toxicol.*, 25(6):496-513.
- Bello, G. J y López de Cerain, S. A. (2001). *Fundamentos de ciencia toxicológica*. Díaz de Santos, España, p 6-20, 25-40, 80-90,128-129, 137-149, 307-309.
- Benavides, G. (1991). Reproducción de dos especies de orégano (*Lippia graveolens* H. B. K. y *Poliomintha longiflora* A. Gray) en la región semiárida de Tamaulipas. En: Meléndez, G. R., Ortega, R y Peña, R.(1991) *Estado actual del conocimiento sobre el orégano en México*. Unidad Regional de Zonas Áridas, UAC, Bermejillo, Durango, México.
- Borrás, T., Morozova, T. V., Heinsohn, S. L., Lyman, R. F., Mackay, T. F., Anholt, R. R., (2003). Transcription profiling in *Drosophila* eyes that overexpress the human glaucoma-associated trabecular meshwork-inducible glucocorticoid response protein/myocilin (TIGR/MYOC). *Genetics*, 163(2):637-645.
- Brusick, D. (1980). *Fundamentals of genetic toxicology*. Plenum Press New York, p11
- Brusick, D. (1987). *Principles of genetic toxicology*. 2° Ed. Plenum New York, p 13-14, 33-35, 44.
- Burlinson, B. (1989). An *in vivo* unscheduled DNA synthesis (UDS) assay in the rat gastric mucosa: preliminary development. *Carcinogenesis*, 10(8):1425-1428.

Bye, R., Linares, E., Estrada, E. (1995). *Biological diversity of medicinal plants in Mexico phitochemistry of medical plants*. Ed. Arnasan.J.T.et al., .Plemun Press New York, p 65-82.

C

Capó, M. M. (2007). *Ecotoxicología. Diagnóstico, tratamiento y gestión del medio Ambiente*. Tébar, p 25-28.

Cases, C. M. A. (2007). Las plantas aromáticas y medicinales. Descripción de las Especies Fundamentales.Principios activos. En: *Jornadas técnicas dedicadas a plantas aromáticas y medicinales*. Instituto Nacional de Investigación y Tecnología agraria y Alimentaria, p 9-12.

Castellanos, G. R. J. (2009). El ambiente regulatorio de los remedios herbolarios en México, antecedentes, situación actual y perspectivas al año 2025. *Boletín de Latinoamérica y del Caribe de plantas medicinales y aromáticas*, 8(1):33-44.

Castillo, E. J. (1986). Introducción al conocimiento de *Poliomintha longiflora* Gray y notas etnobotánicas en la ranchería “Los Picos”, municipio de Higuera, Nuevo León México. Tesis, Facultad de Ciencias Biológicas, UANL, p 57.

Castillo-Juárez. I., González, V., Jame-Aguilar, H., Martínez, G., Linares. E., Bye. R., Romero. I. (2009).Anti-*Helicobacter pylori* activity of plants used in Mexican traditional medicine for gastrointestinal disorders. *J. Ethnopharmacol.*, 122(2):402-405.

- Chaquilla, G., Torrez, V., Ballinas, M. L., Castéllum, M. G., Silva, R., Névarez-Moorillón, G. (2008). Actividad antioxidante del aceite esencial del orégano mexicano (*Lippa berlanderi Schaver*) en sistemas alimenticios. Tercera reunión nacional sobre el orégano. Revista de la Salud y Nutrición, UANL edición especial No.1-2008, Saltillo, Coahuila, México.
- Chung, H., Sztal, T., Pasricha, S., Sridhar, P., Daborn, P. J. (2009). Characterization of *Drosophila melanogaster* cytochrome P450 genes. Proc. Natl. Acad. Sci.USA, 106(14):5731–5736.
- Clark, J. (1964). *Experimental Biochemistry*. Ed. Freeman, W. H *et al.*, San Francisco y Londres, p 228.
- Cohen, S. M. (1993). Imaginal disc development. En: Ed.Bate,M.y Martínez-Arias,(1993). *The development of Drosophila melanogaster Vol. II.A*. New York Cold Spring Harbor Laboratory Press, 13, 747- 841.
- Cook, P.R.,Brazel.I.A.,Jost,E.(1976).Characterization of nuclear structure containing superhelical DNA. J. Cell. Sci., 22(2):303-324.
- Collera, Z. O y García, J. A. F. (2006). Glucósidos terpenoides. En: *Química de la flora Mexicana*. Instituto de Química, UNAM, p 141-143.
- Collins, A. R. (2004). The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations. Mol. Biotechnol., 26(3):249-261.

D

Daniel, M. (2006). *Medicinal Plants. Chemistry and Properties*. Science Publisher  
Enfield, NH. USA., p 7- 11, 55 -60, 140-142.

Deák, P., Omar, M. M., Saunders, R. D., Pál, M., Komonyi, O., Szidonya, J.,  
Maróy, P., Zhang, Y., Ashburne, M., Benos, P., Savakis, C., Side-Kaiamas,  
I., Louis, C., Bolshakon, V, N., Kafatos, F. C., Madueno, E., Modolell, J.,  
Glover, D. M. (1997) .P-element insertion alleles of essential genes on the  
third chromosome of *Drosophila melanogaster* correlation of physical and  
cytogenetic maps in chromosomal region 86E-87F. *Genetics*, 147(4):1697-  
722.

Déciga-Campos, M., Rivero-Cruz, I., Arriaga-Alba, M., Castañeda-Corral, G.,  
Angeles-Lopéz, G., Navarrete, A., Mata, R. (2007). Acute toxicity and  
mutagenic activity of Mexican plants used in traditional medicine. *J.*  
*Ethnopharmacol.*, 110(2):334-342.

De la Rosa, D, M. E y Ruíz, A. L. (1997). Capítulo 6. Mutagénesis y  
Carcinogénesis. En Palacio, A. y América L. (1997). *Introducción a la*  
*toxicología ambiental.*, ECO, p 61-92.

De Vincenzi, M., Stamatti, A., De Vincenzi, A., Salino, M. (2004). Constituents of  
aromatic plants: carvacrol. *Fitoterapia*, 75(7):8001-804.

Doménech, X. (1999). *Química de la contaminación*. Miraguano. Ed. Madrid, p 44-45.

Domínguez, A. X. (1983). *Química Orgánica*. Ed. Continental, México, p 18-22.

Dusinska, M., Collins, A. R. (2008). The comet assay in human biomonitoring: genes-environment Interaction. *Mutagenesis*, 23(3):191-2005.

## E

Ehrenberg, L., Brookes, P., Druckey, H., Lagerlof, B., Litwin, J., Williams, G. (1973). The relation of cancer induction and genetic damage. En: *Evaluation of genetic Ambiospecial*. Reporte No 3 Royal Swedish Academy of Science. Universite for laget, Estocolmo, p 15-25.

Erickson, L. C., Laurent, G., Sharkey, N. A., Kohn, K. W. (1980). DNA cross-linking and monoadduct repair in nitrosourea-treated human tumour cells. *Nature*, 288(5792):727-729.

Esparza-Garrido, R. (2000). Determinación del efecto genotóxico de *Malmea depressa* en células somáticas de *Drosophila melanogaster*. Tesis de licenciatura de la Facultad de Ciencias, UNAM, p 23, 48.

## F

Flórez, O. J. M., Méndez, A. J., Bello, A. (2003). *Guía de plantas y productos medicinales*. CBA, Ciencia y Tecnología, Colombia, p 12-13.

Frei, H. y Würgler, F. E. (1988). Statistical methods to decide whether mutagenicity test data from *Drosophila* assay indicate a positive, negative or inconclusive result. *Mutat. Res.*, 203(4):297-308.

Frei, H. y Würgler, F. E. (1995). Optimal experimental design and sample size for the statistical evaluation of data from somatic mutation and recombination tests (SMART) in *Drosophila*. *Mutat. Res.*, 334(2):247-58

Fristrom, D. y Fristrom, J. W. (1975). The mechanism of evagination of imaginal discs of *Drosophila melanogaster*\*11. General consideration. *Dev. Biol.*, 43(1):1-23.

Funch, S. Yu., Spigelman, V. S., Belitsky, G. A. (1993). The effect of the cytochrome P-450 system inducers on the development of *Drosophila melanogaster*. *J. Biochem. Toxicol.*, 8(2):83-88.

## G

Galloway, S. M. (1994). Chromosome aberrations induced *in vitro*: mechanism, delayed expression, and intriguing question. *Environ. Mol. Mutagen.*, 23(24):44-53.

García-Bellido, A. y Merriam, J. R. (1971). Parameters of the wing imaginal disc development of *Drosophila melanogaster*. *Dev. Biol.*, 24(1):61-87.

- García-Bellido, A., Ripoll, P., Morata, G. (1973). Developmental compartmentalization of the wing disk of *Drosophila*. *Nat. New. Biol.*, 245(147):251-253.
- García-Bellido, A. (1977). Inductive mechanisms in the process of wing vein formation in *Drosophila*. *Dev. Biol.*, 182(2):93- 106.
- García, N. W. R. (2008). Evaluación de *Drosophila melanogaster* como biomonitor en un ambiente laboral. Tesis de licenciatura en Biología, UNAM, p 4-7.
- Garrido, M., Pérez, E. B. E., Villavicencio, N. M. A. (2008). Composición química, actividad antibacteriabal de aceites esenciales y morfología glandular de *Poliomintha longiflora*. UAEH, Tercera Reunión Nacional sobre el orégano, edición especial No 1- 2008, Saltillo, Coahuila, México.
- Garza-Padrón, R. A., Verde-Star, M.J., Morales-Rubio, M.E., Oranday-Cárdenas ,A., Rivas-Morales, C., Núñez-González, M. A y Barrón-González, M. P. (2010). Actividad amebicida, antioxidante y perfil fitoquímico de extractos metanólicos de *astrophytum myriostigma* obtenidos de cultivo de callo y del cactus silvestre. *Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe*, [en línea] Septiembre 2010, [Consultada 15 Octubre de 2010]. Disponible en: <http://redalyc.uaemex.mx/redalyc/pdf/621/62114250008.pdf>.
- Glaforo, J., Alanis, F., Rahim, F. (2004). Cuarenta y cuatro estudios etnobotánicos como fundamentos para nuevos recursos alimentarios: la potencialidad del Orégano de Nuevo León, *Poliomintha longiflora* (A. Gray) en el norte de

Nuevo León, México. Revista de la Facultad de Salud Pública y Nutrición  
Facultad de Ciencias Biológicas, UANL. San Nicolás de los garza, Nuevo  
León, México.

Gocke, E., Wild, D., Eckhardt, K., King, M. T. (1983). Mutagenicity studies with the  
mouse spot test. *Mutat.Res.*,117(1-2):201-12.

Goodlad, R. A., Lee, C. Y., Alion, M. R., Sarraf, C. E., Ghatei, M. A., Bloom, S. R.,  
Wringth, N. A. (1993). Evaluation of a proposed technique to asses  
unscheduled DNA synthesis and genotoxicity. *Gut.*, 34(2):235-241.

González, E. M., López, E. L. I., González, E. S. M., Tena, J. A. (2004). Plantas  
medicinales del estado de Durango y zonas aledañas. CIID Durango,  
México, IPN, p 110.

González-Gaitán, M., Capdevila, M. P., García-Bellido, A. (1994). Cell proliferation  
patterns in the wing imaginal disc of *Drosophila*. *Mech. Dev.*, 46(3):183-200.

González, C. O., Jiménez de Azacárate, J., García, P. J., Aguirre, R. J. (2007).  
Flóra vascular de la sierra de catorce y territorios adyacentes, San Luis  
Potosí, México, *Acta botánica Mexicana*, No 78 .Instituto de Ecología A.C.  
Pátzcuaro, México.

Goyenechea, I. (2008). Diversidad biológica del estado de Hidalgo en Herreria,  
*Revista de divulgación de la ciencia. UAEH*, Vol. 4 No 1, p 23-24.



Graf, U., Würgler, F. E., Kratz, A. J., Frei, H., Juon, H., Hall, C. B., Kale, P. G. (1984). Somatic Mutation and Recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Environ. Mutagen.*, 6(2):153-188.

Green, S., Auletta, A., Fabricant, J., Kapp, R., Manandhar, M., Sheu, C.J., Springer, J., Whitfield, B., (1985). Current status of bioassays in genetic toxicology the dominant lethal assay. A report of the U.S. EPA. *Gene Tox. Program. Mutat. Res.*, 154(1):42-67.

H

Harrison, M. (2006). *Growncovers for the south*. Pineapple Press In. Sarasota, Florida, p 89.

Hernández, S. L., González, R. C. E., González, M. F. (1991). Plantas útiles de Tamaulipas, México. *Anales Ins. Biol. UAM, Ser. Bot.* Vol. 62,1-39.

I.

Ingham, P. W. (1988). The molecular genetics of embryonic pattern formation in *Drosophila*. *Nature*, 335(6192):25-34.

J

Jaime, A. R. H. (2007). *Actividad anti-Helicobacter pilori de extractos de plantas medicinales mexicanas usadas para trastornos digestivos*. Tesis de licenciatura en biología, UAI, p 28,37,41,43,44,48, 54.

Johnston, D., Nüsslein-Volhard, C. (1992). The origin of pattern and polarity in the *Drosophila* embryo. *Cell*, 68(2):201–219.

Jorand, B. (2008). Formas de transformación del conocimiento de la medicina tradicional en los Pueblos nahuas del municipio de Hueyapan, Puebla. *Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal*, Vol.15, No. 44 p 181-196.ENA. [en línea] 2008, [Consultada Marzo 2010] Disponible en: <http://redalyc.uaemex.mx/redalyc/pdf/351/35112197009.pdf>.

K

Klaassen, C. (2001). *Toxicology: the basic science of Poison*. Ed. Casarett y Doull's McGraw Hill, p 1236.

Krishnaswamy, N. R. (2003). *Chemistry of natural products: a laboratory Handbook*. Universites Press, India, p 48.

Kulkarni, A. P., Hodgson, E. (1980). Multiplicity of cytochrome P-450 in microsomal membranes from the housefly, *Musca domestica*. *Biochim. Biophys. Acta*, 632(4):573-88.

## L

- Lawrence, P. A. y Struhl, G. (1996). Morphogens, compartments and pattern: lessons from *Drosophila*. *Cell*, 85(7):951-961.
- Lauwerys, R. (1994). *Toxicología industrial e intoxicaciones profesionales*. Masson, Barcelona, España, p 7-9.
- Lee, W. R., Abrahamsom, S., Valencia, R., VonHalle, E. S., Würgler, F. E., Zimmering, S. (1983). The sex-linked recessive lethal test for mutagenesis in *Drosophila melanogaster*. A report of the U.S. EPA Gene-Tox Program. *Mutat. Res.*, 123(2):183-279.
- Linares, E., Bye R., Flores. (1999). *Plantas medicinales de México. Usos y remedios tradicionales*. Instituto de Biología, UNAM, p 125.
- Margolin, B. H. (1985). Statistical studies in genetic toxicology: a perspective from the U.S. National Toxicology Program. *Environ. Health Perspect.*, 63,187-94.
- Martínez-Flores, S., González-Gallego, J., Culebras, J. M., Tuñon, J, M. (2002). Revisión. Los flavonoides: Propiedades y acciones antioxidantes. *Nutr. Hosp.* XVII Vol. 6,271-278.
- Martín, F. A. y Morata, G. (2006). Compartments and the control of growth in the *Drosophila* wing imaginal disc. *Development.*, 133(22):4421-4426.

Milán, M., Campuzano, S., García-Bellido, A. (1996). Cell cycling and patterned cell proliferation in the wing primordium of *Drosophila*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 93(2):640-645.

Mollet, P. y Würigler, F. E. (1974). Detection of somatic recombination and mutation in *Drosophila*. A method for testing genetic activity of chemical compounds. Mutat. Res., 25(3):421–424.

Muñetón, P. P.(2009). Plantas medicinales: un complemento vital para la salud de los mexicanos. Entrevista con el Mtro. Erick Estrada Lugo. Revista Digital Universitaria [en línea] 10 de Enero 2009 [Consultada 10 de septiembre 2009]. Disponible en: <http://www.revista.unam.mx/vol.10/num9/art58/int58.htm>

Muñoz, M. A. (1998). Comparación de la genotoxicidad de la resina obtenida de la raíz de tres especies del genero *Iponema I. jalapa e I. purga* mediante la prueba de mutación y recombinación mitótica de *Drosophila melanogaster*. Tesis de licenciatura, UNAM, p 17-19.

Muñoz, L. F. (2002). *Plantas Medicinales y Aromáticas. Estudio, Cultivo y Procesado*. Grupo miniprensa, Madrid, España, p 15- 20.

## O

Organización Mundial de la salud, OMS. (2004). Nuevas directrices de la OMS para fomentar el uso adecuado de las medicinas tradicionales. ARP-Sociedad para el Avance del Pensamiento Crítico.

Orozco, H. M. del. C. (2004). Elección de las condiciones mas adecuadas para la obtención de extractos de plantas superiores con actividad sobre una cepa de *Staphilococcus avreus* resistente. Tesis de maestría, UANL, p 1-5.

Östlins, O., Johason, K. J. (1984). Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 123(1):291-298.

Osuna, T. L., Tapia, P. M., Aguilar, C. Abigail. (2005). *Plantas medicinales de la medicina tradicional mexicana para tratar afecciones gastrointestinales*. Estudio etnobotánico, fitoquímico y farmacológico. Publicación i Barcelona, Barcelona, España, p 16- 20.

## P

Peña, C. E., Carter, D. E., Ayala-Fierro. F. (2001). *Toxicología Ambiental: Evaluación de Riesgos y Restauración Ambiental*. UA, p 62-66, 68.

Palomenque, M. T., Carrillo, A. J. A, Loriete, M, P. (2001). Introducción: concepto de manipulación genética y su importancia en el momento actual. En: *Manipulación genética metodología, aplicaciones y bioética*. UNED, p 8-10.

## R

- Rao, D. V. M., Yong. M. D., Ellen-Shaw, M. S., Parton. J. W. (2000). Mutagenicity Testing Applied for Regulation of Developing Products, MicaGenix, Inc West Main Street, Greenfield, IN 46140.
- Raffauf, R. F. (1996). Plant Alkaloids: a guide to their discovery and distribution. Food Products Press, Binghamton, NewYork, p xi.
- Remigio, M. A. C., Pérez, A. G., Fernández, E. N., Bada, B. A. M., Arteaga, P. M., Mancebo, R. A. (2001). Estudio genotóxico *in vivo* de 6 extractos de planta medicinales en células de la medula ósea de roedores. Rev. Toxicol., 18, 75-78.
- Repetto, J. M. (1995). *Toxicología Avanzada*. Ed. Díaz de Santos, España, p 7-14.
- Repetto, J. M. y Repetto K. G. (2009). *Toxicología Fundamental* 4.ºEd. Díaz de Santos, España, p 2-24.
- Reyes, M y Posadas, F. (2006). La biotransformación de los compuestos tóxicos. En: Jaramillo. F., Rincón. A. y Posadas. F. (2006). *Toxicología básica*. Textos universitarios, México, p 53-68.
- Robledo, A. M. A. M. (1990). Aspectos ecológicos y etnobotánicos en el Altiplano Potosino-Zacatecano. Tesis licenciatura Biología, UNAM, p 24-26.

Rodríguez-Arnaiz, R y Ramos, P. (1992). *Drosophila como sistema para detectar agentes genotóxicos*. Prensas de Ciencia, Facultad de Ciencias, UNAM, p 50.

Romero-Jiménez, M., Campos-Sánchez, J., Analla, M., Muñoz-Serrano. A., Alonso-Moraga, A. (2005). Genotoxicity and anti-genotoxicity of some traditional medicinal herbs. *Mutat. Res.*, 585(1-2):147-155.

Rørth, P. (1996). A modular misexpression screen in *Drosophila* detecting tissue-specific phenotypes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 93(22):12418-12422.

S

Sasser, L. B., Cushing, J. A., Dacre, J. C. (1993). Dominant lethal study of sulfur mustard in male and female rats. *J. Appl. Toxicol.*, 13(5):359-368.

Sawhney. S. K., Singh. R. (2002). *Introductory practical biochemistry*. Narosa Publishing House, p 49.

Schmid, W. (1975). The micronucleus test. *Mutat. Res.*, 31(1): 9-15.

Scott, J. G., Lui, N., Wen, Z. (1998). Insect cytochromes P450: diversity insecticide resistance and tolerance to plant toxins. *Comp. Biochem. Physiol. C Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.*, 121(1-3):147-155.

Silbergeld, K. E., Holmberg, B., Högberg, J., Johansson, G., Djuric, D., Misra, R. R., Waalkes, M. P. (1998). *Toxicología*, capítulo 33. Herramientas y

Enfoques. En: *Enciclopedia de salud y seguridad del trabajo*, p 33.7-33.11, 33.44, 33.49, 33.51.

Solomon, E., Bobrow, M. (1975). Sister chromatid exchanges: a sensitive assay of agents damaging human chromosomes. *Mutat. Res.*, 30(2):273-278.

Spanó, M. A., Frei, H., Würigler, F. E., Graf, U. (2001). Recombinagenic activity of four compounds in the standard and high bioactivation crosses of *Drosophila melanogaster* in the wing spot test. *Mutagenesis*, 16(5):385-94.

T

Taidei-Bringas, G. A., Santillana-Macedo, M. A., Romero-Cancio, J. A., Romero-Téllez, M. B. (1999). Aceptación y uso de la herbolaria en medicina familiar. *Salud Pública, México*, 41,216-220.

Török, T., Tick, G., Alvarado, M., Kiss, I. (1993). P-lacW insertional mutagenesis on the second chromosome of *Drosophila melanogaster* isolation of lethals with different overgrowth phenotypes. *Genetics*, 135(1):71-80.

V

Vázquez, F .T. (2008). Comparación de la genotoxicidad de la N-nitrosodimetilamina (NDMA) en dos nuevos mutantes de *Drosophila melanogaster*. Tesis de licenciatura, UNAM, p 16.



Vega, L. y Reyes, S. (2006). Mutagénesis y genotoxicidad química. En: Jaramillo, F., Rincón, A y Posadas, F. (2006). *Toxicología Básica*. Textos universitarios, México, 217-230.

Vogel, E. W., Nivard, M. J., Zijlstra, J. A. (1991). Variation of spontaneous and induced mitotic recombination in different *Drosophila* populations: a pilot study on the effects of polyaromatic hydrocarbons in six newly constructed tester strains. *Mutat. Res.*, 250(1-2):291-298.

Vogel, E. W., Zijlstra, J. A. (1987). Somatic cell mutagenicity in *Drosophila melanogaster* in comparison with genetic damage in early germ-cell stages. *Mutat. Res.*, 180(2):189-200.

Vogel, E. W., Graf, U., Frei, H. J., Nivard, M. M. (1999). The result of assay in *Drosophila* as indicators of exposure to carcinogens. *IARC Sci Pub.*, 149:422-70.

W

Walker, C. (1998). The use of biomarkers to measure the inactive effects of chemicals. *Ecotoxicol. Environ.*, 40(1-2):65-70.

Wilson, T. (2001). Resistance of *Drosophila* to toxins. *Annu. Rev. Entomol.* 46, 545-571.

Woodruff, R. C., Mason, J. M., Valencia, R. y Zimmering, S. (1985). Chemical mutagenesis testing in *Drosophila*. V. Results of 53 coded compounds

tested for the National Toxicology Program. *Environ Mutagen.*, 7(5):677-702.

## Z

Zheng, W. y Wang, S. Y. (2001). Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herb. *J. Agric. Food Chem.*, 49(11):5165-5170.