

00346

9

2 ej.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

Comparación de la genotoxicidad de la resina
obtenida de la raíz de tres especies del género
Ipomoea: *I. orizabensis*, *I. jalapa* e *I. purga*,
mediante la prueba de mutación y recombinación
somáticas de *D. melanogaster*.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE
MAESTRO EN CIENCIAS
(BIOLOGIA CELULAR)

P R E S E N T A :

BIOL. JOSE ARMANDO MUÑOZ MOYA

DIRECTORA DE TESIS: DRA. PATRICIA RAMOS MORALES

MÉXICO, D.F.

257444

1998

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

PAGINACION
DISCONTINUA

PAGINACIÓN
DISCONTINUA

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Genética "Theodosius Dobzhansky" de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional Autónoma de México; y con el apoyo de una beca académica por parte de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (Proyecto IN206595).



VERDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS
División de Estudios
de Posgrado

OF. NUM. P-1076

**DRA. PATRICIA RAMOS MORALES
PRESENTE.**

Por este conducto me permito comunicarle que ha sido ratificada como Directora de Tesis del(a) alumno(a) JOSE ARMANDO MUÑOZ MOYA, quién desarrolló el Trabajo de Tesis titulada: "Comparación de la genotoxicidad de la resina obtenida de la raíz de tres especies del género Ipomoea: I. orizabensis, I. jalapa e I. purga, mediante la prueba de mutación y recombinación somáticas de *D. melanogaster*".

Así mismo, les comunico a los siguientes miembros que la Dirección de la Facultad, los ha designado como sinodales para dictaminar si el trabajo que ha desarrollado como tesis el(a) alumno(a) antes mencionado(a) tiene los méritos para obtener el grado de MAESTRO EN CIENCIAS (BIOLOGÍA CELULAR).

CARGO	GRADO,	NOMBRE COMPLETO
PRESIDENTE	: DRA.	MARIA CRISTINA PEREZ-AMADOR BARRON
PRIMER VOCAL	: DR.	GERARDO HEBERT VAZQUEZ NIN
SEGUNDO VOCAL	: DRA.	PATRICIA RAMOS MORALES
TERCER VOCAL	: DR.	LUIS FELIPE JIMENEZ GARCIA
SECRETARIO	: DR.	JESUS JAVIER ESPINOSA AGUIRRE
SUPLENTE	: DR.	GERMAN CHAMARRO CEVALLOS
SUPLENTE	: DRA.	MARIA EUGENIA GONSEBATT BONAPARTE

Sin más por el momento aprovecho la ocasión para enviarles un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D. F., a 06 de Junio de 1997.
JEFE DE LA DIVISIÓN

DRA. MARGARITA COLLAZO ORTEGA

MCOIASRlpp&

DEDICATORIAS

A mis padres:

Josefina y Fernando por su apoyo, comprensión, cariño y amor; y sobre todo darme la vida. Padre donde quiera que te encuentres este humilde logro es tuyo.

A mi esposa:

Con amor, ya que al estar a tu lado lo puedo lograr todo; gracias por brindarme tu cariño, ternura y comprensión y por tenerme paciencia.

A mis hermanos:

Antonio, Daniel, Guadalupe y Jorge; por brindarme lo mejor de ellos, por su amistad en las buenas y en las malas.

A mi abuela Antonia.

A la familia López Pérez por permitirme formar parte de ellos.

A mis amigos de generación en especial a Toño, Eyra, Javier, Héctor y Fernando, Por pasar momentos tan agradables.

AGRADECIMIENTOS

Mi más sincero agradecimiento y admiración a la Dra. Patricia Ramos Morales a quien le debo este logro y además de compartir sus conocimientos; y enseñarme a superarme día con día. Gracias Paty.

A la Dra. Cristina Pérez-Amador por proporcionar los extractos para la realización de este trabajo y por su apoyo durante la realización de esta investigación.

Al Dr. Javier Espinosa por las atenciones y comentarios durante la realización de este trabajo.

A los sinodales:

Dr. Gerardo Vázquez Nin

Dr. Luis Felipe Jiménez

Dr. Germán Chamorro

Dra. María Eugenia Gonsebatt

Por sus atenciones y valiosos comentarios.

A Héctor y Paty Orozco por brindarme su amistad y de compartir sus conocimientos, con ellos a diario aprendo algo nuevo.

A mis compañeros del Laboratorio: Juan Carlos, Yola, Edna, Lupita, Julián, Blanca, Irma, Moy, Angélica, Yadira, Hugo y Adriana por su compañerismo y apoyo.

ÍNDICE

RESUMEN	iii
INTRODUCCIÓN	
ORIGEN DE LA BIODIVERSIDAD	1
PLANTAS MEDICINALES	1
- Etnobotánica	1
- Metabolitos secundarios	2
TOXICOLOGÍA GENÉTICA	9
- Agentes alquilantes	15
- N-nitrosodimetilamina (DMN)	17
- Metil metanosulfonato (MMS)	22
- Mitomicina C (MMC)	24
ANTIMUTÁGENOS Y ANTICARCINÓGENOS	25
- Naturales extraídos de plantas	29
- Vitamina C	31
- El género <i>Ipomoea</i>	32
- Complejo "Raíz de Jalapa" y usos medicinales	32
- <i>Ipomoea orizabensis</i>	34
- <i>Ipomoea purga</i>	35
- Metabolitos secundarios del Complejo "Raíz de Jalapa"	36
- Uso de glicorresinas en otras especies de <i>Ipomoea</i>	38
- 4- <i>Ipomeanol</i>	30
- <i>Drosophila melanogaster</i> COMO SISTEMA DE PRUEBA	39
- Biología del desarrollo	39
- Metabolismo	41
- Prueba de mutación y recombinación somáticas (SMART)	43
OBJETIVOS	46

MATERIALES Y MÉTODOS	48
- Compuestos químicos	48
- Concentraciones y soluciones	48
- Sistema de cruas	49
- Procedimiento experimental	52
- Tratamientos	52
- Análisis de las alas	57
- Análisis estadístico	57
RESULTADOS	63
DISCUSIÓN	114
CONCLUSIONES	131
BIBLIOGRAFÍA	133

RESUMEN

Gracias a la diversidad de plantas medicinales en nuestro país, los antiguos habitantes distribuidos a lo largo y ancho del territorio nacional hicieron uso de los recursos naturales a su alcance según sus necesidades, conocimiento y tecnología. Las plantas medicinales han y siguen siendo utilizadas tradicionalmente por un sector importante de la población. Su valor curativo se asocia con la presencia de sustancias químicas, llamadas principios activos, muchos de éstos han sido caracterizados fitoquímica y farmacológicamente, pero poco se ha estudiado de la posible interacción entre el metabolito y el material genético de los organismos, o de la actividad genotóxica. La genotoxicidad puede manifestarse por el incremento en la frecuencia de alteraciones genéticas (efecto mutagénico); o bien al interferir la genotoxicidad de otro agente mutagénico (efecto antimutagénico).

En México se conoce con el nombre de "Raíz de jalapa" a las raíces de varias especies de Convolvuláceas que desde la conquista se han empleado en medicina tradicional por contener en sus raíces resinas purgantes. La verdadera "Raíz de Jalapa" es la *Ipomoea purga*, comercialmente se utiliza también a otras especies que se conocen como "falsas jalapas" y que se incluyen en este complejo.

En este estudio se determinó el efecto genotóxico y antimutagénico de plantas medicinales del "complejo jalapa" en células somáticas de las alas de *Drosophila melanogaster*.

Se utilizaron larvas portadoras de dos marcadores autosómicos recesivos, de tal manera que un evento mutacional en las células de los discos imaginales origina un cambio que se manifiesta fenotípicamente en todas las células hijas a partir de la célula madre mutante, constituyendo así un clon celular que se expresará en el adulto con una mancha distinguible. Las resinas que se emplearon fueron: *Ipomoea purga* [50-500 ppm]; *I. jalapa* [250-5000 ppm]; *I. orizabensis* [2500-6250 ppm]; y la resina B (purificada) de *I. orizabensis* [250-5000 ppm]. Para determinar la genotoxicidad de las resinas, larvas de primer y tercer estadio se expusieron durante 48 h a diferentes concentraciones de éstas y después se transfirieron a medio de cultivo fresco hasta la emergencia de los adultos. Para evaluar el efecto protector se utilizaron como inductores de daño y testigos positivos a los mutágenos: N-nitrosodimetilamina, DMN [925 ppm]; Metil metanosulfonato, MMS [1 mM] y Mitomicina C MMC [0.625 mM]; a las concentraciones indicadas se inducen mutación y recombinación somáticas de manera significativa; determinando además la importancia de la edad larvaria en la respuesta

obtenida, por lo cual se usaron dos tipos de protocolos:

1) larvas de 24 ± 4 h de edad se expusieron a 1 ml de la solución de cada resina por separado, la cual se distribuyó sobre la superficie del medio de cultivo (tratamiento crónico). Transcurridas 48 h se extrajeron las larvas y se trataron por 6 h con los mutágenos de prueba en celulosa, por separado (tratamiento agudo), para una exposición total de 48×6 h.

2) larvas de 72 ± 4 h de edad se trataron de forma aguda con los mutágenos de prueba, por separado y después crónicamente con la solución de cada resina, la exposición total fué de 6×48 h.

Se comparó la frecuencia de manchas obtenidas en las series tratadas y sus respectivos testigos para cada resina utilizando X^2 para proporciones y se analizó la dispersión en la distribución del número de manchas por mosca y el número de células por mancha mediante la U de Mann-Whitney.

Se obtuvieron los siguientes resultados:

-Ninguna de las cuatro resinas fue genotóxica en los dos protocolos utilizados.

-La resina de *I. purga* no presentó actividad antimutagénica en contra de la DMN en los dos protocolos.

- La resina de *I. jalapa* no tiene actividad antimutagénica cuando se administra después de la DMN y aumenta la frecuencia de daño inducido por la DMN cuando se administra previo a éste ($P < 0.05$).

-La resina de *I. orizabensis* tiene efecto antimutagénico en contra de la DMN, MMC y MMS, tanto administrada antes como después de los mutágenos ($P < 0.05$).

-La resina B de *I. orizabensis* tiene efecto antimutagénico cuando se administra antes que la DMN, disminuyendo sólo la frecuencia de manchas chicas (que se forman en el desarrollo tardío).

Con base en los resultados obtenidos se sugiere que la resina de *I. orizabensis* tiene efecto antimutagénico (desmutágeno) al reducir el daño oxidativo que resulta de la actividad de los diferentes mutágenos de referencia.

-Se comparó la actividad de la resina de *I. orizabensis* con la de un conocido antioxidante, la vitamina C [100-2500

ppml, bajo las mismas condiciones experimentales, encontrando que disminuye la genotoxicidad de la DMN ($P < 0.05$) cuando se administra posterior al mutágeno y sólo para los eventos inducidos en el desarrollo tardío de *Drosophila*.

INTRODUCCIÓN

Origen de la biodiversidad en México

La diversidad de la flora de México es de las más ricas a nivel mundial. Por lo menos existen unas 26, 000 especies que representan prácticamente a todos los tipos de vegetación, debido en gran medida a la ubicación de nuestro territorio en el planeta y a la historia del continente. Nuestro país, con una orografía variada, alberga en sus sierras, montañas y picos a la flora del norte, de carácter templado o frío; en sus planicies costeras y trópicos a las especies del sur, de carácter cálido. Por otro lado, nuestro país comprende en más del 50 % de su territorio una zona conocida como desierto en la que también prosperó una flora típica, conocida como xerofítica (Krebs, 1985; Estrada, 1985; Rzendowski, 1988; Hengevel, 1989).

Plantas medicinales

Etnobotánica

El conocimiento profundo que los numerosos grupos étnicos de México, distribuidos a lo largo y ancho del territorio nacional, tienen de su flora local, constituye uno de los principales legados de nuestro pasado indígena. Parte relevante de dicha flora son las plantas medicinales, que han sido utilizadas tradicionalmente para aliviar los problemas de salud, principalmente en aquellas zonas en las que la medicina social no ha penetrado (Del Amo, 1979).

Pese a la destrucción irracional de libros y códices mayas y aztecas, encabezada por Fray Juan de Zumárraga en Texcoco y por Fray Diego de Landa en Yucatán en 1562, una cantidad importante de aquel conocimiento se logró salvar, lo que ha servido para comprobar el adelanto logrado por los indígenas en el campo de la medicina herbolaria (Torres, 1996).

Entre las más famosas obras de la tradición indígena se encuentra el *Libellus de Medicinalibus Indorum Herbis* (libro de hierbas medicinales de los Indios), mejor conocido como Códice Badiano, hecho por el médico azteca Martín de la Cruz, pocos años después de la conquista y traducido al latín por el médico mestizo, Juan Badiano. El Códice Badiano es todo un compendio de medicina indígena y gracias a él se conoce de los sorprendentes adelantos de los aztecas en el uso de las plantas medicinales, en enfermedades como el glaucoma, las cefalalgias, sordera, hipo, cataratas, conjuntivitis, hemorragias, parásitos, disentería, gota, hepatitis y estreñimiento, por mencionar algunas (Torres, 1996). La recopilación de la información relacionada con el uso de las plantas con acción medicinal cobra gran importancia, porque promueve la conservación y el uso racional de ejemplares útiles, y aún de otros que se encuentran en peligro de extinción (Del Amo, 1979).

Metabolitos secundarios

El valor medicinal de la planta curativa está asociado a la presencia de sustancias químicas llamadas **principios activos**, los cuales tienen acción terapéutica definida y pueden emplearse para modificar favorablemente los trastornos patológicos originados por la enfermedad (Cabrera, 1975). En medicina natural es importante conocer la distribución de los principios activos en la planta, para lograr la medicación adecuada (Cabrera, 1975; Hernández y Gally, 1981; Alvarez, 1986). La tabla I muestra la localización en los diferentes estratos de los principios activos de la planta del tomillo y el uso terapéutico que se ha asociado con éstos.

Muchos de los principios activos son sumamente complejos y de algunos aún se desconoce la naturaleza química; otros han sido aislados, purificados, e incluso, sintetizados o

Tabla I. Composición química y usos del tomillo (*Thymus vulgaris*), "Menta de Campo" (Cabarrera, 1975; Hernández y Gally, 1981; Alvarez, 1986).

Estrato	Composición química	Usos
Planta completa	Esencias aromatizantes: <ul style="list-style-type: none"> ● fenoles (carvacrol, timol y p-cimol), ● hidrocarburos monoterpénicos y sesquiterpenos, ● aceites esenciales 	Condimento, Propiedades: <ul style="list-style-type: none"> ● antisépticas, antitusígenas y expectorantes, ● excita la secreción de saliva, digestivo, calma los cólicos y ● coadyuvante en el tratamiento de la gastroenteritis, antihelmíntico
Hojas	Flavonoides	Antiespasmódico
Flores	Aceites esenciales	Tónico estomacal
Raíz	Fenoles	Dolor de encías y muelas

biomimetizados. Por lo general, pertenecen a una de estas categorías: **alcaloides, flavonoides, cumarinas, terpenos, esteroides, glicósidos, aceites esenciales, gomas, resinas, aceites grasos, y sustancias antibióticas** (Thomson, 1980; Evans, 1991). La figura 1 muestra la biosíntesis de los diferentes metabolitos secundarios.

Los **alcaloides** forman un grupo diverso de compuestos alcalinos con marcada actividad fisiológica; su estructura anular es generalmente compleja y siempre contiene nitrógeno. Entre éstos se encuentran la morfina, la cocaína, la nicotina, la quinina y otros 5500 más. Más del 90 % de los alcaloides se encuentran en las angiospermas (Thomson, 1980; Evans, 1991). Las familias con mayor contenido de alcaloides son: Apocynaceae, Solanaceae, Rubiaceae, Liliaceae, Umbelliferae, y sobre todo, la Asclepiadaceae, que contienen el 18 % de todos los alcaloides conocidos. Los géneros más ricos son *Nicotiana*, *Vinca* (fuente de vincristina y vinblastina, dos compuestos que se emplean en la terapia contra la leucemia) y *Strychnos*. Las especies más ricas incluyen la adormidera, *Papaver somniferum* (fuente del opio) con 25 alcaloides, y *Rauwolfia serpentina* (fuente del hipotensor y tranquilizante reserpina), con aproximadamente 30 (Thomson, 1980; Evans, 1991).

Los **flavonoides**, que se encuentran tanto en estado libre como heterosídico, constituyen el grupo más amplio de los fenoles naturales. En la actualidad se conocen más de 2000 de estos compuestos, de los que unos 500 se encuentran en estado libre. Estos derivados son conocidos por sus efectos antiinflamatorios y antialérgicos, sus propiedades antitrombóticas y vasoprotectoras, la inhibición de la promoción de tumores y como protectores de la mucosa gástrica. Efectos que se han atribuido a la influencia de los flavonoides sobre el metabolismo del ácido araquidónico (Evans, 1991). Muchas plantas que contienen flavonoides son diuréticas (buchú

y retana) o antiespasmódicas (regaliz y perejil). Algunos flavonoides poseen propiedades antibacterianas y antifúngicas y otros son colorantes tánicos (Thomson, 1980; Evans, 1991).

Las **cumarinas**, que son derivados de la α -pirona, han sido poco estudiadas (Evans, 1991); así como las antocianinas o pigmentos antociánicos. Las **cumarinas**, derivados del benzo- α -pireno, son comunes en las plantas, tanto en estado libre como en el de heterocidos. Hasta hoy se han aislado unas 1000 cumarinas naturales. La cumarina se ha encontrado en unas 150 especies, que se distribuyen en más de 30 familias diferentes. Da un característico olor a heno fresco y se encuentra en muchas leguminosas. Se utilizan en la manufactura del tabaco y en perfumería, para el tratamiento de dolencias reumáticas posee una larga reputación y su efecto terapéutico parece ser potenciado por el *Taraxacum* en contra de la bronquitis asociada a deficiencia vascular (Thomson, 1980; Evans, 1991).

La mayoría de los **esteroides** y saponinas esteroidales presentan un oxhidrilo en el C-3 y tienen un origen biogenético común, vía ácido mevalónico y unidades isoprenoides. Están menos distribuidas en la naturaleza que los flavonoides. Estudios fitoquímicos han demostrado su presencia en muchas familias de las monocotiledóneas, especialmente en *Discoreaceae*, *Amaryllidaceae* y *Liliaceae*. Entre las dicotiledóneas, la presencia de diosgenina en la alholva (*Leguminosaceae*) y alcaloides esteroidales en *Solanum* (*Solanaceae*), posee importancia potencial. Algunas especies de *Strophanthus* y *Digitalis* contienen saponinas esteroides y heterocidos cardiotónicos. Las saponinas esteroides son de gran interés e importancia por su relación con compuestos como las hormonas sexuales, cortisona, esteroides diuréticos, vitamina D y heterosidos cardíacos. Algunas se utilizan como material de partida para la síntesis de éstos. La diosgenina es la principal sapogenina empleada por la industria; los ñames, de

los que se aísla, contienen una mezcla de sapogeninas en forma glicosídica (Thomson, 1980; Evans, 1991).

Los **glicósidos** son compuestos que, cuando están hidrolizados, producen un componente de uno o varios azúcares (por ejemplo el glicón), y uno sin azúcar (aglicón). Hay muchas variedades de glucósidos, clasificados según el tipo de aglicón. Entre los más importantes para la medicina están los glucósidos cardíacos (presentes en las familias Asclepiadaceae, Liliaceae, Moraceae, Apocynaceae, Convolvulaceae, Escrofulareaceae). La digitalis, una de las drogas de origen vegetal más prescrita, es un glicósido que se emplea para combatir problemas cardíacos (Thomson, 1980; Evans, 1991).

Los glicósidos cianógenos que producen ácido cianhídrico, también han sido localizados en alrededor de 2 mil especies, de 112 familias de angiospermas (Thomson, 1980; Evans, 1991).

Los **aceites esenciales** tienen, por lo general, varios componentes químicos, usualmente derivados **terpénicos**, o de compuestos aromáticos. A menudo contienen alcoholes, cetonas, aldehídos, fenoles, éteres, ésteres entre otros. Muchos son germicidas potentes; esta propiedad está asociada con su volatilidad y capacidad para penetrar al citoplasma, sin embargo, al ser insolubles en agua, su uso se restringe como antisépticos en medicina. Son valiosos como carminativos, antitusígenos, antisépticos bucales, para hacer gargarismos, pulverizaciones y ungüentos (Thomson, 1980; Evans, 1991).

Las **resinas** son sustancias con brillo característico y de naturaleza química compleja. Por calentamiento se ablandan y, finalmente, funden. Son insolubles en agua y éter de petróleo, pero se disuelven casi completamente en alcohol, cloroformo, y éter. Desde el punto de vista químico, las resinas son mezclas complejas de ácidos resínicos, alcoholes resínicos (resinoles), fenoles resínicos (resinos-tanoles), ésteres y compuestos químicamente inertes denominados resenos. Son productos de la

oxidación de los aceites esenciales; ambos se utilizan como purgantes y ungüentos (Thomson, 1980; Evans, 1991).

Los **aceites grasos**, o lípidos -ésteres de ácidos grasos- se emplean en emulsiones y como purgantes (Thomson, 1980; Evans, 1991).

Las **sustancias antibióticas** son compuestos orgánicos, derivados de organismos vivos o producidos por ellos, y que a pequeñas concentraciones, inhiben procesos vitales de los microorganismos (Thomson, 1980; Evans, 1991).

Gomas: La farmacopea británica define el tragacanto como el exudado gomoso endurecido al aire, que fluye de forma natural u obtenido por incisiones del tronco y ramas de *Astragalus gummifer* Labillardiere y otras especies de *Astragalus*, crecidas en Asia accidental. El género *Astragalus* (Leguminosae) contiene unas 2000 especies, siendo las principales, en cuanto a rendimiento de goma. Las gomas están compuestas de unidades de azúcar y ácido urónico. Entre los productos se han identificado: ácido galacturónico, D-galactopiranososa, L-arabofuranosa y D-xilopiranososa (ácido arábico). Se utilizan como laxante mecánico (goma esterculina); Sus propiedades demulcentes son empleadas en diversos preparados para la tos, diarrea y dolencias de la garganta (goma arábica) (Evans, 1991).

Los alcaloides y los glicósidos, obran generalmente sobre las funciones orgánicas como la circulación, la respiración, y otras; o bien, sobre sistemas como el sistema nervioso, por lo que su acción es generalizada en el organismo. Los alcaloides suelen ser efectivos aun en dosis muy bajas, se puede decir que hay pocos venenos minerales que ejerzan una acción tóxica tan rápida como la de muchos alcaloides, así la digitalina, la eserina, la aconitina, paralizan las funciones orgánicas en dosis pequeñísimas. De allí el riesgo de emplear una planta empíricamente, y eso indica también la dificultad del estudio

de las propiedades terapéuticas de la flora (Cabrera, 1975).

Además de los glicósidos y alcaloides, las plantas contienen sales minerales que ejercen una acción energética, y más activa que si se emplearan las mismas sales obtenidas por procedimientos químicos. Se ha sugerido que ésto se debe a que en la planta, los iones de esas sales parecen encontrarse, en estados coloidales con cargas eléctricas que provocan equilibrios fácilmente dissociables, y que al ser introducidos en otro organismo reaccionan no sólo por acción química sino también por acción biológica. De allí la ventaja de emplear de preferencia plantas frescas. La desecación provoca la pérdida de actividad; por ejemplo las que tienen aceites esenciales, en las que con el tiempo la esencia se volatiliza perdiendo sus propiedades, o disminuyendo su potencia (Cabrera, 1975).

Se han aislado más de 12,000 metabolitos secundarios orgánicos, muchos de ellos han resultado útiles en medicina pero, si se utilizan sin control, su uso puede ser contraproducente, al producir efectos colaterales indeseables y aún, ser mutagénicos, carcinogénicos o bien, teratogénicos. Un factor de importancia en esta práctica es que, en la mayor parte de los casos ocurre sin dosificación específica, ni vigilancia médica (Tabla II). Por lo anterior se deben conocer también las propiedades de sus componentes individuales y de las interacciones entre éstos, que posean por ejemplo, propiedades mutagénicas, carcinogénicas, teratogénicas; o bien, anticancerosas, hipertensoras y antimicrobianas demostrables (Thomson, 1980).

TOXICOLOGÍA GENÉTICA

Por otro lado, la exposición de los seres vivos a sustancias contaminantes potencialmente reactivas presentes en el ambiente es frecuente. La interacción entre los organismos y los contaminantes ambientales es un proceso que se lleva al

Tabla II. Efectos colaterales producidos por los componentes activos de algunas plantas medicinales (Evans, 1991).

Género y especie	Componentes	Efectos
<i>Senecio spp</i>	Alcaloides pirrolizidícos: lasiocarpina, retrorsina	Posibles teratógenos en ratas y, en vacas, muertes in útero
<i>Indigofera spp</i>	Indospicina	Fisura palatina y mortalidad en embrión de rata. Teratogénico

Género y especie	Propiedades y acción	Aplicaciones
<i>Senecio scandes</i>	Baja la fiebre y protege la vista	Malaria, conjuntivitis aguda, disenteria, y enteritis
<i>Indigofera tinctoria</i>	Baja la temperatura, disipa la depresión, desinflamatorio	Laringitis, paperas, inflamaciones, sarna, sarpullido

cabo por períodos prolongados e incluye concentraciones mínimas de estos, por lo que en muchas ocasiones se dificulta la detección del efecto provocado. Se calcula que más de 100,000 productos químicos han sido elaborados para uso comercial e industrial (aditivos de alimentos, cosméticos, medicamentos, pesticidas y muchos otros más) (De Serres, 1979). Muchos de éstos son capaces de provocar daño con efectos a corto, mediano y largo plazo. En la tabla III se muestra una clasificación de mutágenos ambientales propuesta por Moutschen (1985).

Una parte importante de los compuestos exhiben su actividad al interactuar con el DNA. La inducción de mutaciones génicas y aberraciones cromosómicas puede ocurrir en las células sexuales generándose alteraciones heredables; o bien, si los cambios genéticos ocurren en las células somáticas, pueden causar el desarrollo de cáncer (Loprieno, 1980; De Flora y Ramel, 1988). Además, el daño a los ácidos nucleicos puede ser producto de la acción de mutágenos endógenos, cuyos efectos tienden a acumularse en función del tiempo, y contribuyen de manera importante al envejecimiento celular y a diversas enfermedades degenerativas, algunas de ellas asociadas con el cáncer (Orozco, 1993). Algunos procesos endógenos son: oxidación por estrés oxidativo (Halliwell, 1994; Hartman, 1981; Ames, 1983), metilación, etilación, desaminación y despurinización (Saul y Ames, 1986).

En la figura 2 se muestran algunas de las interacciones posibles entre factores físicos y químicos con el DNA. Dichos procesos son modificados además, por parámetros fisicoquímicos como: lipofilicidad, actividad óptica, interacción con enzimas, factores estéricos, reactividad absoluta y relativa, mono o multifuncionalidad, entre otros (Zijlstra, 1987; Waters et al., 1990). En la figura 3 se muestran las principales rutas por las que ingresan, se distribuyen y excretan los diferentes compuestos. La principal ruta de distribución es el sistema

Tabla III. Clasificación de mutágenos ambientales
(Moutschen, 1985)

Grupo I.- Sustancias mutagénicas sintetizadas por el hombre y usos específicos.

Farmacéuticas	Plaguicidas	Aditivos
<ul style="list-style-type: none"> ●Agentes antitumorales ●Narcóticos ●Anticonceptivos ●Excipientes ●Anestésicos 	<ul style="list-style-type: none"> ●Insecticidas ●Herbicidas ●Raticidas ●Fungicidas ●Moluscicidas ●Nematicidas 	<ul style="list-style-type: none"> ●Alimentos ●Cosméticos ●Otros

Grupo II.- Sustancias usadas en la industria o presentes en el ambiente como subproductos industriales.

<ul style="list-style-type: none"> ● Agentes alquilantes industriales. ● Disolventes orgánicos, compuestos organometálicos. ● Contaminantes del agua. ● Contaminantes del aire. ● Metales pesados.

Grupo III.- Sustancias de origen natural.

<ul style="list-style-type: none"> ● Alcaloides. ● Productos del metabolismo microbiano.
--

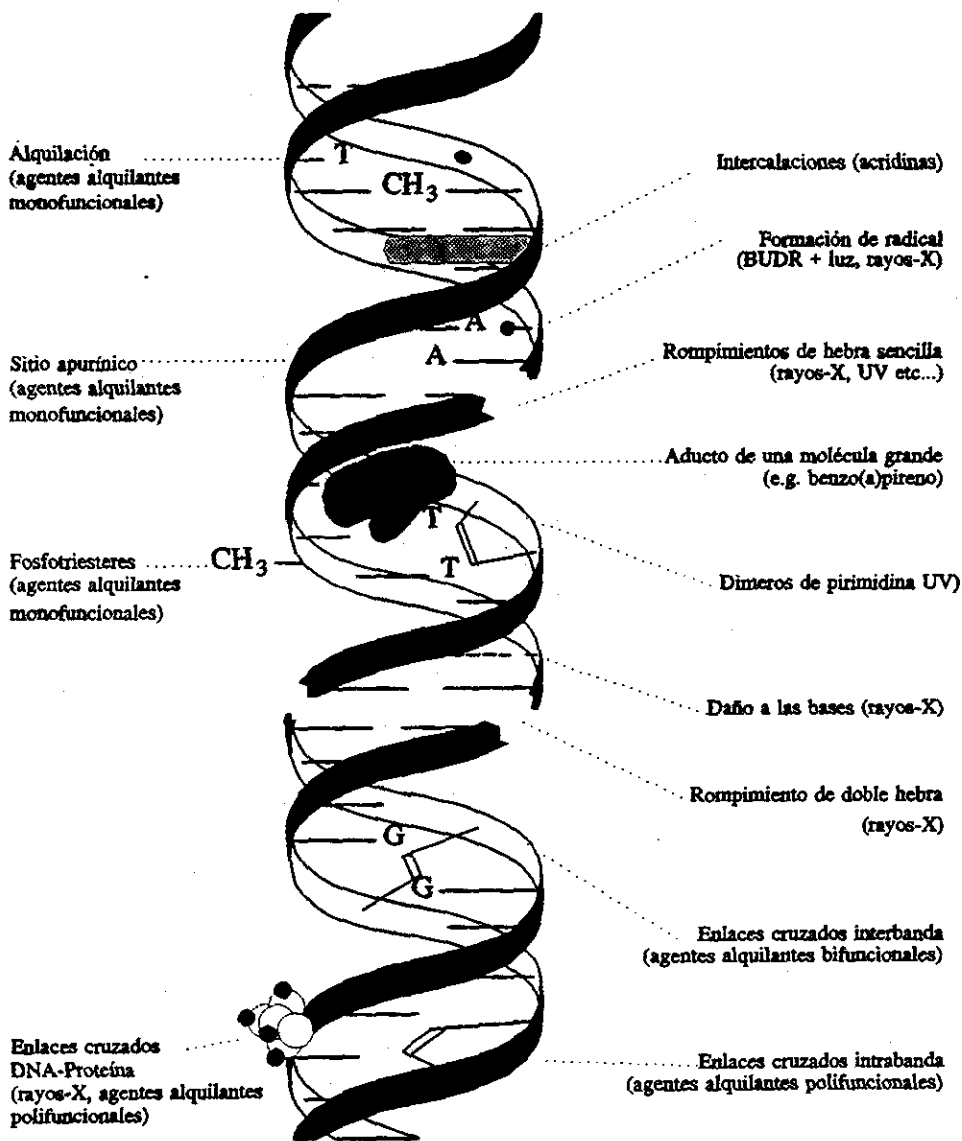


Fig. 2 Interacción del DNA con agentes físicos y químicos (Obe y Natarajan, 1982).

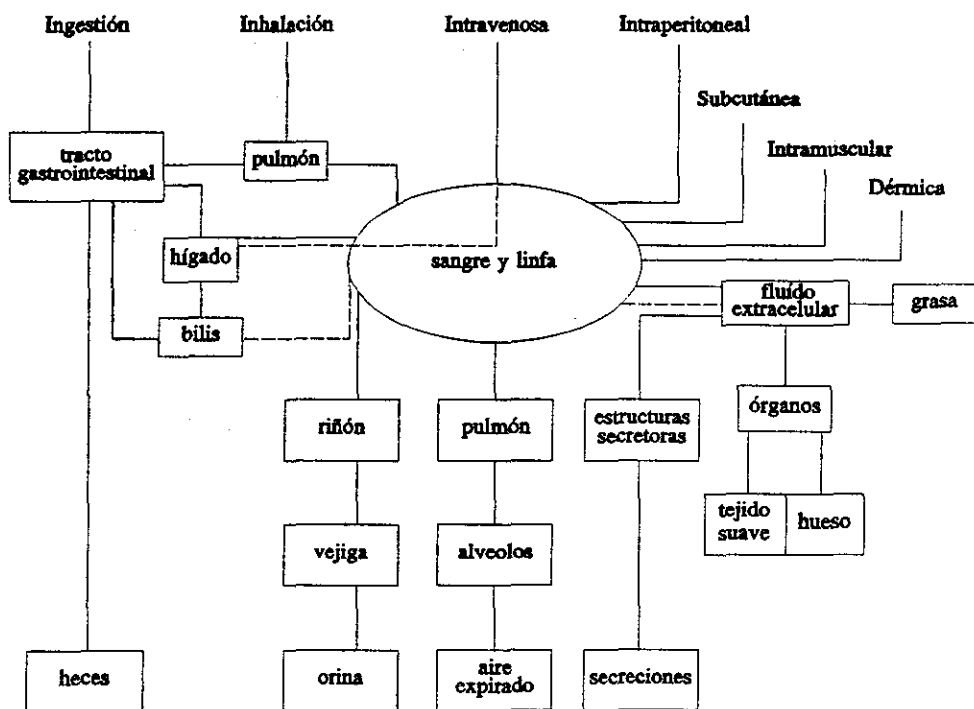


Fig. 3 Rutas de exposición y excreción de sustancias en el hombre (Klaassen, 1975).

circulatorio, mediante el cual los compuestos son transportados para alcanzar al órgano blanco, llegar a los sistemas de excreción y eliminación, o bien, a los tejidos en los que pueden ser almacenados (Klaaseen, 1975; Sorsa y Vainio, 1982).

Los agentes químicos que no son constituyentes propios del organismo son denominados compuestos **xenobióticos** y pueden clasificarse básicamente en dos tipos dependiendo de la forma en la que funcionan: 1) de manera directa (mutágenos), si son reactivos por si mismos, es decir, no requieren ser activados mediante el metabolismo del organismo expuesto, y reaccionan con macromoléculas como el DNA y las proteínas, por consiguiente, son detectados fácilmente por los sistemas de prueba; y 2) de manera indirecta, es decir, al no ser genotóxicos por si mismos (promutágenos), requieren ser activados por las enzimas presentes en los organismos a derivados reactivos electrofílicos (Obe y Natarajan, 1982; Vogel, 1992).

Agentes alquilantes

Los agentes alquilantes son compuestos sumamente reactivos que adicionan un grupo alquilo (etilo o metilo) en varias posiciones sobre las bases del DNA y con ello alteran las propiedades de apareamiento de las bases involucradas. En mutagénesis química se utilizan como sustancias modelo para estudiar la relación causa-efecto debido a que su interacción con el DNA y otras macromoléculas es conocida (Vogel, 1992).

La metilación o etilación ocurre por mecanismos unimoleculares (S_N1) y bimoleculares (S_N2) de sustitución nucleofílica (Lawley, 1984). En principio, todos los átomos de nitrógeno y oxígeno nucleofílicos pueden ser alquilados por estos agentes, pero el alcance con el que el agente en particular alquila al DNA está relacionado al carácter S_N1 ó S_N2 . Los agentes que actúan vía mecanismo S_N2 reaccionan

eficientemente sólo con el átomo más nucleofílico (N7 de la guanina y N3 de la adenina); pocos agentes reaccionan por mecanismo S_N1 y son menos selectivos. Los reactantes alquilan nitrógenos altamente nucleofílicos y sitios menos nucleofílicos incluyendo átomos de oxígeno (O6 de la guanina y del fosfodiéster) (Heflich, 1991). Varios compuestos han sido evaluados en el modelo de carcinoma de Walker en ratas, que ha mostrado tener mayor sensibilidad a estos compuestos (Hellman, 1972).

En eucariontes, la única base que se ha encontrado metilada en el DNA es la 5-metilcitosina, la cual es de 3 a 5 % más abundante que la citocina en el DNA animal y mucho más abundante en algunos DNA de plantas, pero está virtualmente ausente en otros DNA, como en el caso de algunos insectos. La síntesis de un residuo 5-metilcitosina en el DNA es similar a la reacción de la timidilato sintetasa; un residuo nucleofílico de la enzima (probablemente un grupo tiol) ataca al carbono 6 del anillo pirimidico de la citosina, la cual activa el carbono 5 para la formación de un enlace carbono-carbono. En el DNA de procariontes las bases más metiladas son N⁶-metiladenina y en menor cantidad la N⁴-metilcitosina, lo que corresponde a menos del 1 % (Mathews y van Holde, 1990).

En bacterias la metilación ocurre en sitios específicos. En *E. coli* la metilación de residuos A en la secuencia 5'...GATC...3' participa en la corrección de errores de apareamiento y metilación de otros sitios del DNA protegidos contra cortes de las endonucleasas de restricción. En animales, la metilación se encuentra sólo en residuos C que tienen inmediatamente al extremo 5' residuos G, en una secuencia ...CpG...; cuando una C es metilada, la C correspondiente en la cadena complementaria, también lo es. En el DNA de plantas la secuencia es CpNpG..., donde N puede ser cualquier base. Además se ha probado que la metilación en un sitio particular es un

fenómeno heredable. Cuando el DNA eucariontico se duplica, la actividad de una metilasa asegura que todos los sitios que fueron metilados en el DNA parental, estén metilados en el DNA de las duplex hijas y por otro lado, los sitios desmetilados así permanecen (Mathews y van Holde, 1990).

Algunos agentes alquilantes, particularmente los difuncionales (con dos grupos alquil reactivos), inducen entrecruzamiento de cadena de DNA-DNA y/o DNA-proteínas y originan rompimientos en los cromosomas y varias clases de aberraciones cromosómicas asociadas con alteración de la integridad del DNA (Vogel, 1992). Otros agentes alquilantes exhiben menor especificidad en su mutagenicidad como los análogos de bases, ácido nitroso o acridinas, los cuales inducen todos los tipos de mutación, incluyendo transiciones, transversiones, rompimientos y aberraciones cromosómicas, con frecuencias relativas dependiendo de la especificidad del alquilante empleado (Horsfall et al., 1990). La tabla IV muestra algunos agentes alquilantes y el órgano blanco en el que produce cáncer (roedores).

N-Nitrosodimetilamina (DMN)

La N-Nitrosodimetilamina, Dimetilnitrosamina, N-metil-N-nitrosometamina (DMN) (Index Merck 1989); es ampliamente usada en estudios de mutagénesis, es un alquilante, promutágeno, y un carcinógeno potente (EMS, 1976). Induce tumores en diferentes partes del organismo según sea la ruta de administración, por ejemplo, la administración de 25 y 50 ppm de la DMN en la dieta de conejos durante tres meses, ocasiona carcinomas hepatocelulares (EMS, 1976); en ratas sometidas a inhalaciones repetidas se inducen tumores en las cavidades nasales y en el riñón (EMS, 1976); cuando se administra por vía oral a diferentes líneas de ratones provoca sarcomas, carcinomas y adenomas en pulmón (EMS, 1976). La DMN metila al DNA y provoca

Tabla IV. Agentes alquilantes y organo blanco que alcanza en roedores (Leutzinger y Richie, 1995).

Agente alquilante	Organo blanco
● Dietilnitrosamina (DEN)	● Hígado
● Dibutilnitrosamina (DBN)	● Vejiga urinaria
● Diamilnitrosamina (DAN)	● Pulmón
● 2,3-dimetil-4-aminofenil (DMAB)	● Prostata
● Nitrosobis(2-oxipropil)amina (BOP)	● Hígado
● N-metil-N-nitrosoourea (MNU)	● Pancreas

inestabilidad metabólica por hidroxilación del átomo alfa; se produce una hidroximetil-metil-nitrosamina inestable, la cual origina un ion alquildiazonium y posteriormente un ion carbonium, que es la molécula reactiva análoga (Vogel, 1992) (Fig. 4). Al ser administrada a ratas, la DMN se metaboliza a una forma que metila activamente al DNA en un número apreciable de sitios diferentes. Un producto del DNA formado por la acción metilante es la O⁶-metilguanina, que se forma en los sitios dG/dC. La DMN induce específicamente la formación de tumores en el riñón de las ratas, a pesar de que la O⁶-metilguanina se produce en el DNA de otros órganos, tales como el hígado, de la misma forma que en el DNA de las células del riñón. Tanto el riñón como el hígado poseen sistemas que eliminan la O⁶-metilguanina del DNA y lo reparan. La susceptibilidad de las células de riñón a la inducción de tumores por la DMN, en comparación con las del hígado, se relaciona con la disminución en la eficiencia del sistema reparador del riñón para eliminar del DNA O⁶-metilguanina a dosis elevadas de DMN (Ayala, 1994).

En células germinales de *Drosophila* la DMN induce mutaciones letales recesivas ligadas al sexo y pérdida cromosómica (Vogel y Natarajan, 1979a y b). En células somáticas de *Drosophila*, induce mutación y recombinación a concentraciones que van desde 0.5 a 50 mM (Delgado, 1990; Ordaz, 1991; García, 1992; Muñoz-Moya, 1994).

El descubrimiento de la actividad carcinogénica de la N-nitrosodimetilamina ha permitido establecer que los compuestos N-nitroso y otros agentes alquilantes puedan ser una clase importante de compuestos carcinogénicos (Laval et al. 1990). La figura 5 muestra las características físico-químicas de la N-nitrosodimetilamina.

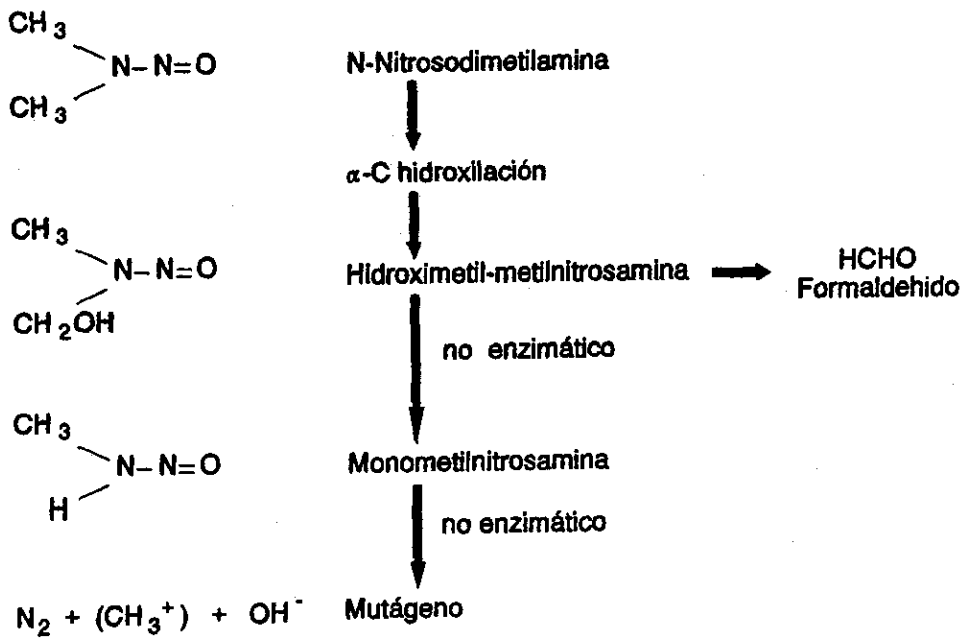
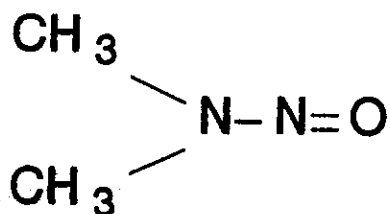


Fig. 4 Biotransformación de la N-Nitrosodimetilamina (DMN)
(Margison y O'connor, 1979)



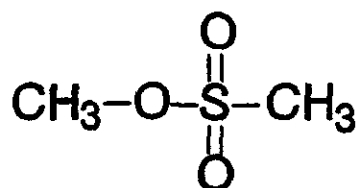
$(\text{CH}_3)_2\text{NNO}$
C(32 %), H(8.16 %), N(37.82 % y O(21.6%)
PM=74.08 g
Densidad=1.008
Líquido amarillo
Miscible en agua
Soluble en alcohol y éter
Volátil

**Fig. 5 Características físico-químicas de la N-Nitrosodimetilamina
(Index-Merck, 1989)**

Metil metanosulfonato, (MMS)

El metilmetano sulfonato, ácido metasulfónico metil ester, metil mesilato (MMS) (Index Merck 1989); es un alquilante monofuncional, mutagénico de acción directa y potente carcinógeno EMS, 1976). Es un metil ester del ácido metanosulfónico, se utiliza como catalizador en reacciones de polimerización, alquilación y esterificación y como disolvente en la brominación de tinte índigo. Pertenece a los alquilalcanosulfonatos, que al igual que los alquilsulfatos tienden a reaccionar como moléculas neutrales por un mecanismo de asociación S_N2 , que consiste en el ataque a los anillos del nitrógeno altamente nucleofílicos (Horsfall et, al, 1990).

La capacidad de los agentes alquilantes monofuncionales como el MMS y EMS de producir deleciones en *Drosophila* ha recibido considerable atención (Lim y Snyder, 1974). Al comparar cromosomas X de 22 líneas de *Drosophila* probadas para la inducción de mutaciones letales recesivas ligadas al X por MMS con el aspecto de los cromosomas X de células de las glándulas salivales, no se encontraron evidencias citológicas de deficiencias pequeñas (Vogel y Natarajan, 1979b). Otros estudios reportan de 17 a 54 % de mutaciones letales inducidas por MMS asociados con deleciones detectables citológicamente (Fahmy y Fahmy, 1961; Lim y Snyder 1969). Más recientemente se ha determinado que en el cromosoma X, la gran mayoría de los mutantes presentaban lesiones restringidas a un solo loci (Liu y Lim, 1975; Vogel y Natarajan, 1979a). En células somáticas induce mutación y recombinación a 1 mM (Delgado, 1990; Ordaz, 1991). La figura 6 muestra las características físico-químicas del Metilmetanosulfonato.



$\text{C}_2\text{H}_6\text{O}_3\text{S}$

C(21.81 %), H(5.49 %), O(43.28%) y S(29.11%)

PM=110.3 g

Densidad=1.298

Líquido

Miscible en agua

Soluble en disolventes no polares

**Fig. 6 Características físico-químicas del Metil metanosulfonato
(Index-Merck, 1989).**

Mitomicina C, (MMC)

La mitomicina C, ameticina, mutamicina, Mitocin C (MMC), aislada de *Streptomyces caesipitosus*; es un promutágeno, agente alquilante mono o bifuncional (provoca entrecruzamientos en el DNA) (Adler, 1981). La activación es mediada por la enzima citocromo c reductasa-NADPH, que se reduce a un derivado hidroquinona por una de las enzimas pertenecientes al grupo de quinonas reductasas (diaforasas), facilitando la protonación del nitrógeno aziridina y promoviendo la alquilación de centros nucleofílicos (Pan et al., 1984; Keyes et al., 1984; Marshall y Rauth, 1986). Las mitomicinas son sustancias básicas coloreadas que forman placas o cristales en aguja de color rojo-violeta. La mitomicina C se emplea en el tratamiento de adenocarcinomas de estómago, páncreas, pulmones, cuello uterino, de la leucemia mieloide crónica y en la enfermedad de Hodking; como profiláctico después de la cirugía o de la irradiación de sarcomas, epitelomas y carcinomas de orígenes variados (Adler, 1981; Salmon y Sortoralli, 1990).

La MMC produce ligamientos ó enlaces cruzados DNA/DNA, DNA/proteínas o uniéndose a una base sencilla del DNA por alquilación del O⁶ de la guanina, también pueden producir monoadductos en el DNA, proteínas alquiladas y especies citotóxicas de oxígeno (Kennedy et al., 1980; Marshall y Rauth, 1986). Los efectos de la MMC han sido evaluados en diferentes sistemas de prueba:

En *Salmonella typhimurium* induce reversión de his- a his+ (Kim y Levin, 1986). En células CHO y en células de médula ósea murina produce intercambio de cromátidas hermanas (ICHs) (Darroudi et al., 1989; Morales et al., 1990). Produce mutaciones letales dominantes en células germinales de hembras de ratón y aberraciones cromosómicas (Hashimoto et al., 1987). En Bovinos y en búfalos, produce ICHs (Iannuzzi et al., 1990). En general, la MMC provoca muerte celular, mutaciones génicas,

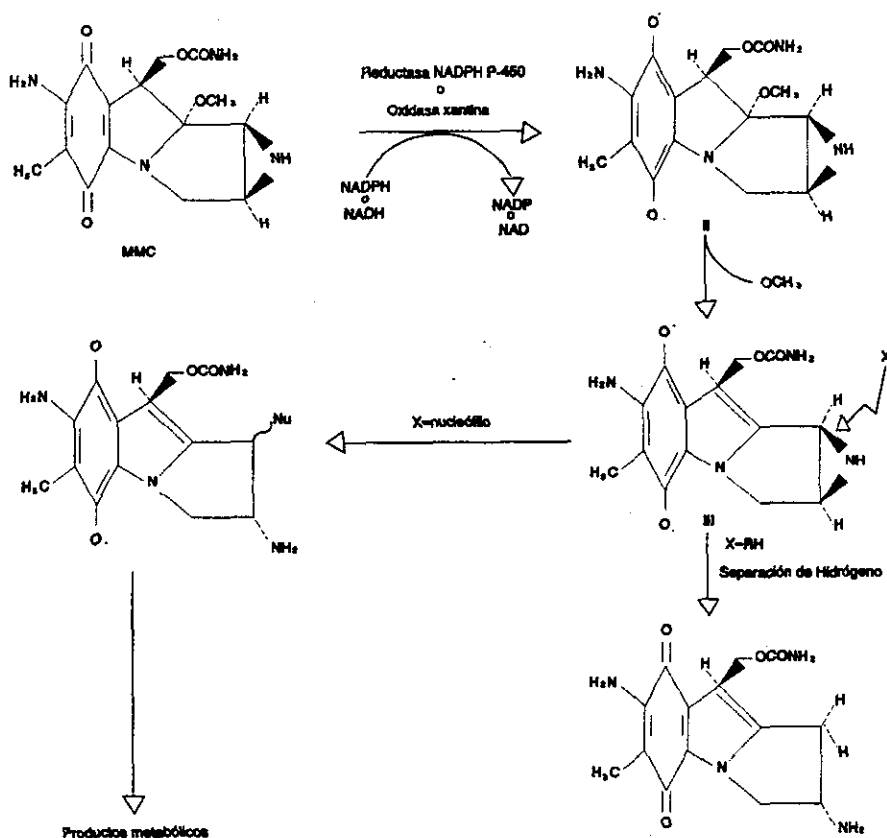
aberraciones cromosómicas e intercambio de cromátidas hermanas en varios organismos (procariontes y eucariontes) tanto *in vivo* como *in vivo* (Mayer y Flam, 1975).

Los efectos de la MMC han sido extensamente estudiados en ambos sexos de *Drosophila*, produciendo mutaciones recesivas ligadas tanto en machos como en hembras (Cunha et al., 1994). En hembras incrementa la frecuencia de pérdida del cromosoma X en anillo (de Andrade et al., 1992). En células somáticas induce mutación y recombinación a 0.625 mM (Graf et al., 1984; Orozco, 1993; Gaytan, 1993). En la figura 7 se observan las características físico-químicas y la bioactivación de la mitomicina C.

ANTIMUTÁGENOS Y ANTICARCINÓGENOS

Debido a las graves implicaciones del cáncer, se han investigado mas de 1500 agentes de origen natural que pueden combatirlo y desde 1985 se han desarrollado algunos agentes quimiopreventivos que empiezan a utilizarse en clínica, en la que se incluyen antimutágenos y anticarcinógenos naturales (Kelloff et al., 1995); estos agentes son: antimetabolitos, hormonas, enzimas, antibióticos, vitaminas (A, B, C, D y E), agentes alquilantes, saliva entre otros (Novic y Szilar, 1952; Sainsbury, 1979; Stock, 1970; Pratt y Ruddon, 1979; Nishioka y Nunoshiba, 1986; Waters et al., 1990; Evans, 1991 ; Petru et al., 1995; Shankel, 1995). La tabla V muestra una lista de antimutágenos de diferentes tipos. Es necesario mencionar que existen antimutágenos y anticarcinógenos que actúan a través de mecanismos múltiples, abarcando un amplio intervalo de niveles de intervención (De Flora y Ramel, 1988).

De más de 1500 compuestos ya sea de origen natural o sintético, se ha estudiado su capacidad para inhibir a otras sustancias capaces de inducir carcinogénesis y mutagénesis en



$\text{C}_{15}\text{H}_{18}\text{N}_4\text{O}_5$
 C(35.71 %), H(42.86 %), N(9.52 %) y O(11.90 %)
 PM=334.19 g.
 Cristales azul-violeta
 Miscible en agua
 Soluble en disolventes orgánicos

Fig. 7 Características físico-químicas (Index-Merck, 1989), y activación enzimática de la Mitomicina C (MMC): formación de un radical anión (II) y eliminación de metanol, para formar un intermediario III. División del anillo aziridina y ataque nucleofílico para formar productos metabólicos y 2,7-diaminomitoseno por separación de un hidrógeno (Pan *et al.*, 1984).

Tabla V. Antimutágenos de diferentes tipos, ilustrando la gran variedad de sustancias y compuestos involucrados (Shankel, 1995).

Antimutágenos	Referencia
<p>Compuestos inorgánicos simples:</p> <ul style="list-style-type: none"> ● Cloruro de cobalto ● Cloruri de manganeso ● Selenio 	<ul style="list-style-type: none"> ● Mochizuki y Kada, 1982 ● Arditti y Sermonti, 1962 ● Ames, 1985
<p>Compuestos orgánicos complejos:</p> <ul style="list-style-type: none"> ● Cafeína ● Espermina y otras poliaminas ● Nucleósidos de purina ● Metionina ● Ácido ellagico 	<ul style="list-style-type: none"> ● Grigg y Stuky, 1966 ● Sevag y Drabble, 1962 ● Novick y Szilard, 1952 ● Clarke, 1965 ● Aukerman et al., 1883
<p>Mezclas complejas:</p> <ul style="list-style-type: none"> ● Extracto de placente humana y de otros mamíferos ● Saliva humana ● Extractos de plantas (e.g. <i>G. glabra</i>). ● Ácido húmico 	<ul style="list-style-type: none"> ● Kada y Mochizuki, 1981 ● Nishioka y Nunoshiba, 1986 ● Nitscher et al., 1986 ● Sato et al., 1987

modelos experimentales. Estos representan varias clases de niveles estructurales y actividades biológicas, y han sido caracterizados como antimutágenos. Ejemplos de clases estructurales son los: arilalquil-isotiocianatos, compuestos cinamílicos, flavonoides, glucaratos, resinas glicosídicas, indoles, polifenoles, retinoides y caratenoides, y tioles y sulfidas. Clases con actividad biológica: antihormonas, agentes anti-inflamatorios, antioxidantes, inhibidores del metabolismo del ácido araquidónico, inductores de glutatión, inhibidores de la ornitina descarboxilasa e inhibidores de la proteína cinasa C. Estos compuestos y sus posibles mecanismos de acción se prueban en sistemas experimentales para de esta manera determinar su actividad. Se incluyen estudios genéticos tanto *in vivo* como *in vitro* que se relacionan con la carcinogénesis (mutagenicidad, lesiones precáncerosas, uniones al DNA, enzimas activas), y otros que inhiben la aparición de tumores en animales experimentales (Kelloff et al., 1995). Los mecanismos de inhibición de la mutagénesis y de la carcinogénesis son variados y dependen de la etapa en que intervienen en cada proceso, de los patrones de modulación y de las estrategias de defensa del organismo, entre otros (Ramel, 1986). Las características que deben tener los antimutágenos y los anticarcinógenos son las siguientes: actividad rápida, inhibir la formación o activación de sustancias, incrementar las rutas metabólicas de desintoxicación, impedir la unión de moléculas extrañas al DNA, incrementar los niveles o fidelidad en la reparación, atrapar reactivos electrofílicos y atrapar los radicales libres (Kelloff et al., 1995).

Los compuestos que actúan extracelularmente son llamados **desmutágenos** y su actividad se puede ubicar en diferentes niveles: 1) al inhibir la entrada de los mutágenos o de sus precursores a la célula; 2) al interferir la formación endógena de mutágenos; 3) al desactivar mutágenos (Kada et al., 1982).

Y aquellos que pueden actuar intracelularmente (Ramel, 1986) o **antimutágenos** (Kada et al., 1982), los cuales: 1) modulan el metabolismo; 2) bloquean moléculas reactivas; 3) modulan la replicación o la reparación del DNA.

Antimutágenos y anticarcinógenos extraídos de plantas

Entre los diferentes antimutágenos y anticarcinógenos se han reportado algunos productos extraídos de plantas. Se ha mostrado que las fracciones de alcaloides extraídos del mirto (*Vinca rosae*), así como el principio activo de *Maytenus diversiflora* conocido como maytancina tienen propiedades antileucémicas en ratón (Pratt y Ruddon, 1979; Lee et al., 1982); los extractos de *Wikstroemia indica*, de la que los principales agentes son tricina kaempferol-3-O-B-D-glucopiranosido y la nortachelogenina también son antileucémicos. En ratón, la dafnoretina se ha reportado como un potente anticancerígeno *in vivo* (Lee et al., 1981).

En *Witheringia coccoloboides* se han aislado dos fracciones: la fisalina y 25, 26-epidihidrofisalina que son citotóxicas *in vitro* en células cancerígenas de ratón; además, la fisalina B tiene actividad moderadamente antileucémica en ratones *in vivo* (Antoun, et al., 1981).

La investigación de nuevos compuestos antitumorales de origen natural no se limita a plantas superiores, si bien, la mayoría de éstos tienen este origen (Evans, 1991) (Tabla VI).

En células somáticas de *Drosophila* se comparó la genotoxicidad de extractos obtenidos de la raíz, el tallo y la flor de *Tagetes filifolia* (Compositae), aunque los extractos no fueron mutagénicos, un hallazgo importante fue que los extractos de raíz y flor disminuyeron ($P < 0.05$) la frecuencia de mutaciones inducida por la N-nitrosodimetilamina (DMN), un potente alquilante (García et al., 1992).

Tabla VI. Algunos compuestos anticancerosos procedentes de plantas (Evans, 1991).

Familia	Fuente	Clase	Compuesto
Convolvulacea	<i>Ipomoea batatas</i>	Monoterpenos	4-Ipomeanol
Compositae	<i>Liatrina chapmanii</i>	Sesquiterpenos	Liatrina
Euphorbiaceae	<i>Jatropha gossypifolia</i>	Diterpenos	Jatrofina
Crupressaceae	<i>Juniperus chinensis</i>	Lignanos	Podofilotoxina
Bignoniaceae	<i>Jacaranda caucana</i>	Quinonas	Jacaranona
		Alcaloides	
Leguminoceae	<i>Crotalaria spectabilis</i>	Pirrolizidina	Monocrotalina
Rutaceae	<i>Acronychia baueri</i>	Acridona	Acronicina
Lilaceae	<i>Colchicum speciosum</i>	No heterocíclico	Colchicina
Rubiaceae	<i>Bouvardia ternifolia</i>	Péptidos	Buwardina

Vitamina C

La vitamina C (L- ácido ascórbico, ácido L, 3-cetotreo hexuronico lactona), es sintetizada en muchos animales. En humanos y en otros primates, como no tienen activa la enzima L-gulonolactona oxidasa, requieren una dieta que contenga vitamina C (Ganong, 1991), la cual es esencial para algunas funciones fisiológicas. La deficiencia de ésta favorece la aparición de enfermedades oportunistas y la suplementación con una variedad de vitaminas se ha relacionado con una reducción importante de la mutagénesis y la carcinogénesis (Petru et al., 1995).

En el proceso de la carcinogénesis, un número de funciones fisiológicas son particularmente relevantes y son moduladas por el suministro de vitaminas: a) en la formación *in vivo* de carcinógenos o de sus precursores; b) al detener y/o transportar los carcinógenos a través de la membrana; c) en la activación metabólica implicada en la desintoxicación de carcinógenos; d) en la generación/captura de radicales libres o reactivos intermediarios de carcinógenos; e) al interferir/promover la diferenciación y la proliferación celular, en la expresión génica y las señales de traducción; y f) en la potenciación/supresión de la respuesta inmune (Petru et al., 1995).

En particular, la vitamina C modula la carcinogénesis y mutagénesis por varios caminos probables: a) el ácido ascórbico puede inhibir o prevenir la formación de nitrosaminas, bloqueando la reacción de las aminas secundarias con los agentes nitrosantes bajo condiciones ácidas (Sidney y Mirsvish, 1986; Arcos et al., 1988). Se propone como agente profiláctico en contra de la formación *in vivo* de compuestos carcinógenos N-nitroso; b) la vitamina C está involucrada en las reacciones de hidroxilación microsomal catalizadas por una mezcla de oxidasas de función mixta (MOFM); de esta manera dependiendo de tipo de

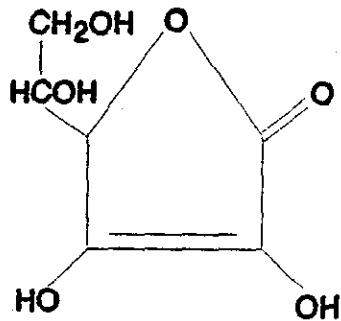
carcinógeno involucrado el ácido ascórbico puede modificar la actividad (MOFM) y en consecuencia afectar la activación o desintoxicación (Combs, 1992); c) es un antioxidante a concentraciones fisiológicas óptimas, ya que puede atrapar radicales libres y especies activas de oxígeno, además de proteger al material genético contra el daño oxidativo (Petru et al., 1995; Shamberg, 1982); d) sin embargo, a concentraciones altas puede actuar como prooxidante, generando radicales peróxido e hidroxilo que pueden ser catalizados por la presencia de iones libres férricos y cúpricos; el significado *in vivo* de estas reacciones no es clara (Petru, 1995); e) el ácido ascórbico potencia varias funciones inmunes (Milner, 1989). En células somáticas de *Drosophila melanogaster* la Vitamina C inhibe eficientemente el efecto genotóxico de la mitomicina C (Gaytan, 1993). La figura 8 muestra la estructura y características físico-químicas de la vitamina C.

El género *Ipomoea*

Otra familia de plantas de uso etnobotánico y medicinal en México es la Convolvulaceae, familia de 35 géneros y 1650 especies. La mayoría son herbáceas, anuales o perennes, frecuentemente con tallos trepadores; pocas son arbustos y árboles. Entre sus géneros está *Ipomoea*, del cual se han descrito 600 especies y se encuentra de manera silvestre en casi todo México, aunque predomina en el estado de Veracruz (Evans, 1991).

Complejo "Raíz de Jalapa" y usos medicinales

La "Raíz de Jalapa" constituye uno de los recursos tradicionales de México más conocidos en el extranjero debido a sus propiedades medicinales; los tubérculos de Convolvuláceas con propiedades purgantes llegaron a España hacia el año 1565 (Evans, 1991). La "jalapa" fue conocida principalmente por su



$C_6H_8O_6$
C(40.91 %), H(4.58 %), y O(54.51 %)
PM=176.12 g.
Cristales en lámina
Miscible en agua
Insoluble en disolventes grasos, éter,
cloroformo y benceno.

**Fig. 8 Características físico-químicas de la Vitamina C
(Index-merck, 1989).**

acción purgante y emética, sin embargo se le atribuye actividad antihelmíntica y emenagoga (Martínez, 1959). Farmacológicamente esta clasificada como catártico e hidragogo (Bauser, 1937; Wallis, 1966).

En México se conoce con el nombre de "Raíz de Jalapa" a las raíces de varias especies de Convolvuláceas que desde antes de la Conquista se ha empleado en medicina tradicional por tener en sus raíces resinas purgantes. La verdadera "Raíz de Jalapa" es *Ipomoea purga* (Jaúregui, 1855), sin embargo existen en el mercado raíces de otras especies que se conocen como "falsas jalapas" y también se expenden como "Raíz de Jalapa" (Pedraza, 1982). La difusión internacional que consiguió la raíz de Jalapa a partir de la Conquista española y el éxito de sus aplicaciones como purgante trajo como consecuencia la búsqueda de otras especies que tuvieran resinas purgantes y que sirvieran para sustituir la droga. La mayoría de las especies que se han utilizado para la obtención de resinas en México, pertenecen al género *Ipomoea*; sin embargo, en otros países se han utilizado además, especies de otros géneros como *Convolvulus*, *Operculina* y *Merremia*, principalmente.

Entre el complejo "Raíz de Jalapa" se encuentran *I. orizabensis*, *I. purga* e *I. jalapa*, todas plantas herbáceas. Se conocen vulgarmente como "raíz de escamonea de México", "Jalapa de Orizaba" o "Raíz de Jalapa".

Ipomoea orizabensis

La Jalapa de Orizaba o resina escamonea mexicana, es la raíz desecada de la *I. orizabensis*, planta voluble, fusiforme de unos 60 cm de longitud. La raíz se colecta en el estado de Veracruz en la localidad de Orizaba. La Jalapa de Orizaba se utiliza principalmente para la preparación de la resina de su nombre. Los indígenas utilizaban esta planta como purgante (Evans, 1991). La resina de *I. orizabensis* es más soluble en

éter que la resina de Jalapa (Evans, 1991).

La superficie externa de la raíz está recubierta por un súber de color pardo grisáceo y arrugado. La superficie del corte transversal es grisácea o pardusca y muestra unos tres anillos concéntricos de haces fibrovasculares (Evans, 1991).

El tejido parenquimatoso, tanto de la región cortical como de la central, recuerda al de la Jalapa, por contener almidón y oxalato cálcico. Al igual que en ésta, en los cortes se aprecian numerosas células secretoras dispersas en un contenido resinoso. La droga contiene olor ligero, y sabor ligeramente acre. Cuando se extrae con alcohol (90 %) da alrededor del 10 al 20 % de una mezcla resinosa compleja, de la que aproximadamente el 65 % es soluble en éter. Los principales componentes de la resina de Orizaba son metil-pentosas y otros heterósidos del ácido jalapínólico y su éster metílico. También hay sitosterol y heterósidos de fitosterol (Evans, 1991).

Ipomoea purga

Raíz de Jalapa, la Jalapa está constituida por los tubérculos o raíces tuberosas, desecados, de la *I. purga*, de tallos volubles. La mayor parte de la droga se exporta del este de México. Los tubérculos de jalapa son fusiformes, napiformes o irregularmente oblongos y de unos 3-15 cm de longitud. Son sumamente duros y pesados. La superficie está cubierta de súber pardo oscuro, arrugado y señalado por lenticelas transversales y de color más claro. Los trozos mayores pueden tener incisiones efectuadas para facilitar la desecación. Los tubérculos se pueden ablandar, para realizar cortes en ellos, mediante maceración prolongada en agua. En corte transversal se aprecia un interior grisáceo, un anillo cambial completo, bastante próximo a la parte externa y con numerosas líneas oscuras irregulares en su interior. La droga posee ligero olor empireumático; el sabor es al principio dulzaino y acre

después. La Jalapa contiene del 18 al 19 % de resina en sus células secretoras, que dan un color amarillo como agua de yodo. Puede extraerse de la droga pulverizada con alcohol hirviente (90 %). Vertiendo una tintura concentrada en agua, la resina precipita y puede ser recogida, lavada y desecada (Evans, 1991).

La complejidad de estas resinas de Convolvuláceas dificulta su aislamiento en forma pura, habiendo sido estudiadas mediante investigación de los productos de su hidrólisis (ácidos grasos volátiles de cadena corta, ácidos grasos hidroxílicos y azúcares) (Evans, 1991).

Metabolitos secundarios presentes en el complejo "Raíz de Jalapa"

Los tubérculos del complejo "Raíz de Jalapa" contienen en general, almidón, oxalato cálcico, azúcar no cristalizable, goma, materia colorante y dos resinas; la jalapina y la convolvulina, ácido jalapínolico y algunas sales minerales (Cabrera, 1975).

El principio activo es la resina, que obra como un purgante energético, provoca afluencia de líquidos en el intestino por acción irritativa, lo que aumenta la producción de bilis y estimula los movimientos peristálticos (Cabrera, 1975).

Las resinas purgantes de las convolvuláceas, están formadas por una mezcla de glicorresinas. Estas son compuestos de naturaleza lipídica que tienen en su molécula un ácido graso oxhidrilado enlazado a varias unidades de azúcares, algunos esterificados con ácidos volátiles. La figura 9 muestra la estructura de la orizabina I, una glicorresina obtenida de la "raíz comercial de Jalapa" (Noda et al., 1987).

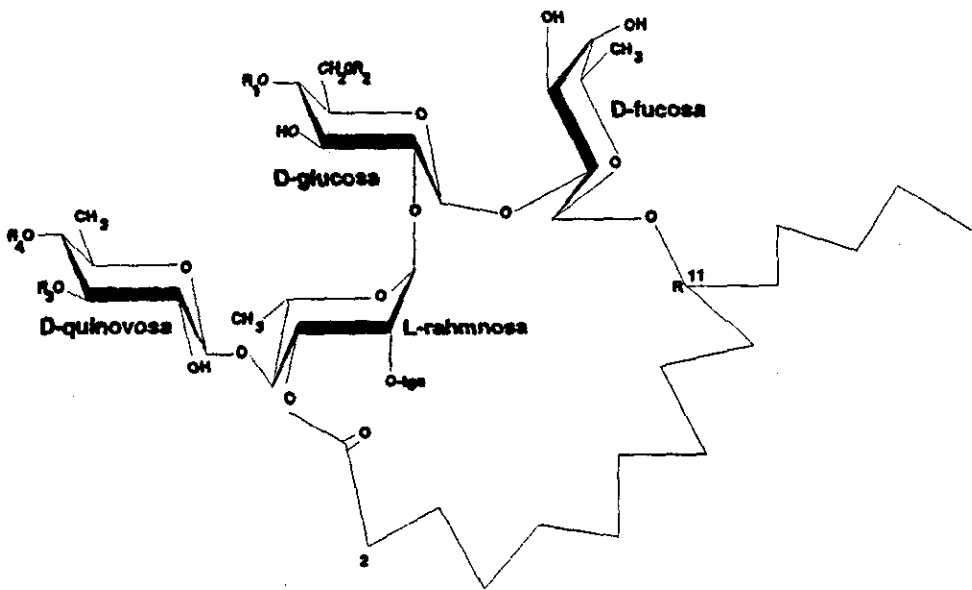


Fig. 9 Estructura de la orizabina I, una glicoresina obtenida de la "raíz comercial de jalapa". Está formada por el ácido jalapnólico (11-hidroxipalmitico, unido a cuatro azucares: fucosa, glucosa esterificada con ácido nilico, rahmnosa, con ácido tíglico y quinovosa, con ácido metilbutírico) (Noda *et al.*, 1987).

Uso de glicorresinas de otras especies de *Ipomoea*

A las glicorresinas, además de propiedades purgantes, se les atribuyen otras propiedades. Se ha mostrado que las resinas glicosídicas de ciertas especies de *Ipomoea* tienen actividad antitumoral en ratones. *I. orizabensis* inhibe el crecimiento del sarcoma 37 (Bilkin et al., 1952); *I. leari* muestra actividad contra el carcinoma de Walker 256 en ratas (Bhakuni et al., 1969; Sarin et al., 1973); e *I. bahiensis*, es activa contra la progresión del sarcoma 180, en ratones (Bieber et al., 1986).

La actividad antimicrobiana de las glicorresinas aisladas de *I. bahiensis* se ha reportado contra una gran cantidad de microorganismos representativos de hongos y bacterias gram (+) y gram (-) (Bieber et al., 1986).

4-*Ipomeanol*

Otro producto relacionado es el 4-*Ipomeanol*, toxina aislada del camote (*Ipomoea batatas*) infectado por hongos, que cuando se ingiere, afecta al pulmón y riñón de los mamíferos. El 4-*ipomeanol* es oxidado selectivamente por enzimas de ciertas células del pulmón, para dar un aldehído reactivo; así se provee de un potente agente alquilante, tan sólo en las células que contienen el sistema enzimático activado (que aparentemente son células que han sido alteradas o dañadas) (Evans, 1991; Verschoyle et al., 1993). El 4-*Ipomeanol* es una droga nueva que se empieza a emplear en personas afectadas por cáncer bronquioalveolar (Rehm y Devor, 1993).

Así, la investigación de la actividad genotóxica de compuestos derivados de plantas de uso medicinal y el estudio de su potencial protector y modulador, puede aportar elementos valiosos en la campo de la salud (Brusick, 1987). Muchos metabolitos secundarios han sido caracterizados fitoquímica y

farmacológicamente, pero poco se ha estudiado la posible interacción entre el metabolito y el material genético de los organismos, o actividad genotóxica. La actividad genotóxica puede manifestarse por el incremento en la frecuencia de alteraciones genéticas (**efecto mutagénico**); o por el contrario, puede ocurrir que el compuesto interfiera con la formación de alteraciones genéticas inducidas inicialmente por otro compuesto mutagénico (**efecto antimutagénico**).

***Drosophila melanogaster* COMO SISTEMA DE PRUEBA**

La mosca de la fruta, *Drosophila melanogaster*, ha sido utilizada en pruebas de mutagénesis de manera rutinaria. En este organismo se pueden analizar un amplio espectro de alteraciones genéticas inducidas por agentes ambientales, tanto en células somáticas como en células germinales (Rodríguez-Arnaiz y Ramos, 1992).

Biología del desarrollo

Desde el momento en que la larva eclosiona del huevo, hasta que emerge el imago (adulto), el ciclo de vida de *Drosophila* es aproximadamente de 192 horas a 25 ± 1 °C. La larva pasa por tres estadios y dos mudas larvales, la primera muda ocurre a las 25 horas y la segunda a las 48, la formación del pupario se da aproximadamente a las 96 horas (Demerec, 1965; Roberts, 1986; Ramos et al., 1993) (Fig. 10).

En apariencia, las células imagales que no están involucradas en actividades esenciales de la larva, son distinguibles de las células larvales por su tamaño pequeño, constitución diploide de los cromosomas, retención de la capacidad de división celular, y porque alcanzan su diferenciación hasta que entran a la metamorfosis, están

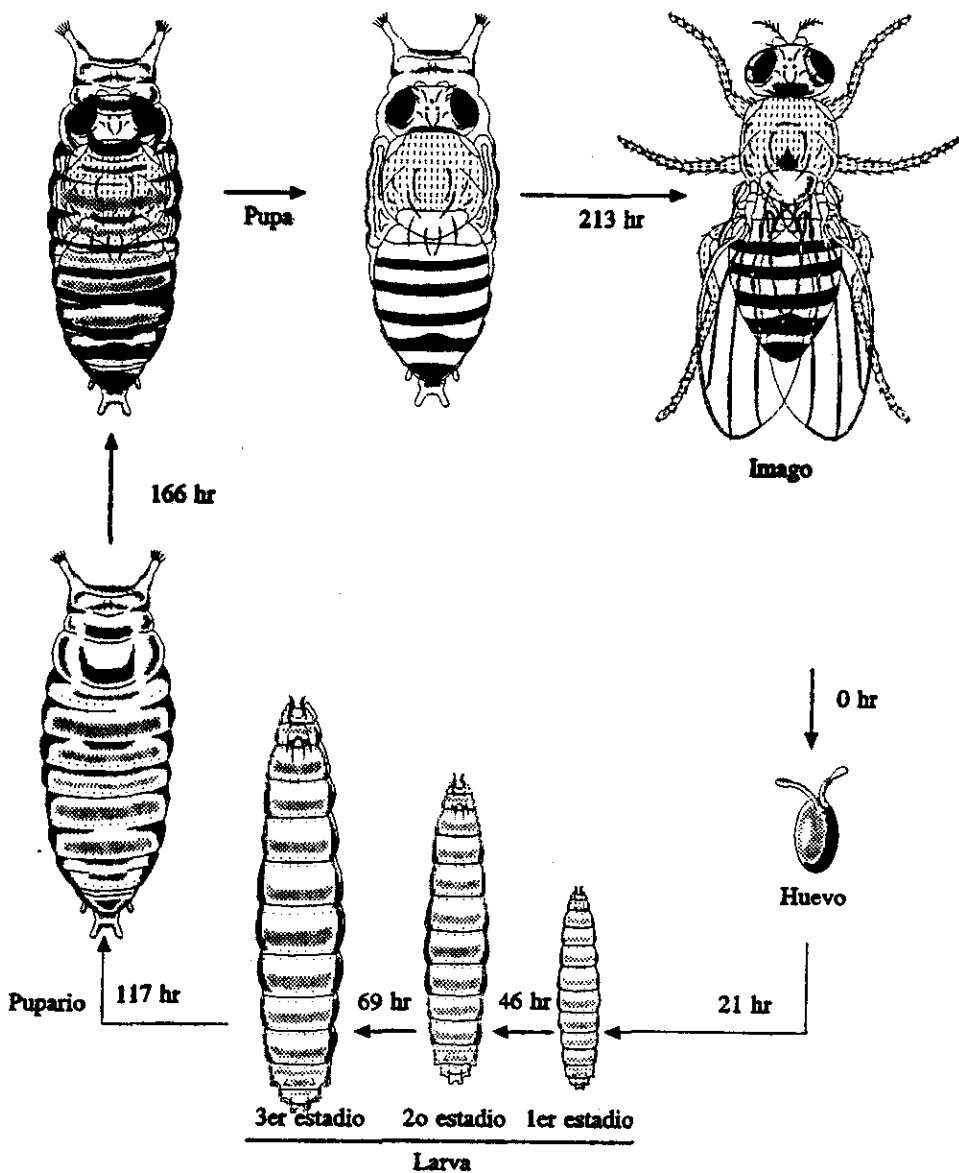


Fig. 10 Ciclo de vida de *Drosophila melanogaster*, duración de los estadios a 25°C.

contenidas en los discos imagales, estructuras en forma de saco que aumentan de tamaño por las mitosis sucesivas durante el desarrollo larvario. Las células larvarias forman el cuerpo de la larva, estas células han perdido su capacidad de división y solamente aumentan de tamaño por presentar politenia (duplicación del ADN sin citocinesis) (Demerec, 1965; Wilkins, 1986; Würgler y Vogel, 1986; Pomerai, 1990).

Durante la metamorfosis, la hormona ecdisona desencadena una serie de cambios en el organismo, que involucra la destrucción de ciertos tejidos y órganos de la larva, y la organización de las estructuras del adulto, a partir de las células de los discos imagales. Los tubos de Malpigi se alteran poco durante la metamorfosis, aunque sí sufren algunos cambios en su composición estructural; el tórax se forma por la combinación de varios discos imagales. Las extremidades, ojos, antenas, alas y el aparato genital se diferencian a partir de su disco imagal respectivo que sufre una histogénesis durante el desarrollo pupal (Fig. 11).

Metabolismo

La biotransformación de compuestos no reactivos a metabolitos mutagénicos antecede en ocasiones a la inducción de mutaciones. En la modificación química de los compuestos participan diversas enzimas cuya actividad depende de genes específicos y en consecuencia, la diversidad en la información genética de los organismos se manifiesta en la diferente capacidad de éstos para llevar al cabo esta biotransformación; en la que se generan a su vez, compuestos con estabilidad química variable como algunos electrófilos que interaccionan con el ADN. Las lesiones premutagénicas, producto de esta interacción son, reparadas también mediante la participación de enzimas, ya sea por mecanismos libres de errores, en cuyo caso la alteración se elimina; o por mecanismos sujetos a error,

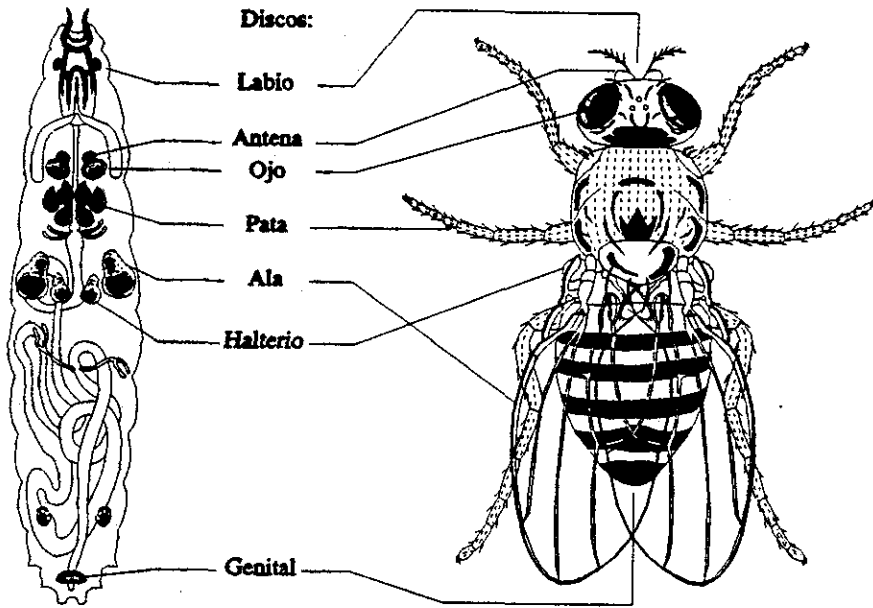


Fig. 11 Los discos imagales de *Drosophila melanogaster* originan diversas estructuras del adulto por una serie de divisiones mitóticas.

mediante los cuales se fijan y promueven las mutaciones (Ramel, 1986; Waters et al., 1990).

Los análisis bioquímicos realizados tanto en larvas como en organismos adultos de *Drosophila melanogaster*, han revelado que poseen alta capacidad de activación-desintoxicación, por la presencia de enzimas dependientes de citocromo P-450, similares a la fracción S9 del hígado de mamíferos (Baars et al., 1980; Hällström et al., 1992). El sistema citocromo P-450 de estos organismos se encuentra distribuido en mayores concentraciones en el intestino medio, en los cuerpos grasos y en los túbulos de Malpigi. A nivel subcelular, las monooxigenasas se encuentran localizadas en retículo endoplasmático liso y en las mitocondrias (Kulkarni y Hodgson y, 1980; Hodgson y Randy, 1991).

Prueba de mutación y recombinación somáticas (SMART)

La prueba de mutación y recombinación somáticas (Somatic Mutation and Recombination Test, SMART), es una metodología que se basa en el desarrollo de *Drosophila*, de manera que la inducción de alteraciones durante el desarrollo en la información genética de las células imagales se manifiesta fenotípicamente en todas las células hijas derivadas de la célula madre mutante, constituyendo así un clon celular que se expresará en el cuerpo de la mosca adulta como una mancha mutante distinguible, cuando se utilizan marcadores fenotípicos apropiados (Baker et al., 1978; Graf et al., 1984; Vogel y Zijlstra, 1987) (Fig. 12).

Es un sistema que permite detectar la capacidad de los compuestos para inducir mutación y recombinación a nivel somático. Este tipo de estudios cobran día con día gran importancia debido a que existe correlación entre la actividad recombinogénica y la carcinogénesis.

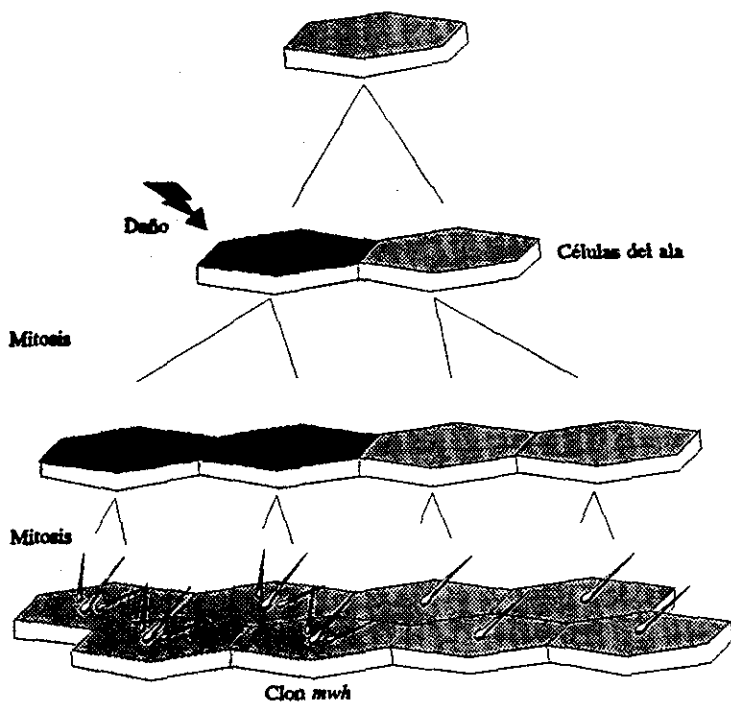


Fig. 12 Producción de un clon *mwh* en células alteradas, mediante división mitótica.

Cuando se evalúan compuestos alquilantes, la SMART tiene valores altos de sensibilidad (0.75 - 0.78) y especificidad (0.83 - 0.86) (Vogel, 1987; Graf y Würigler, 1988; Vogel y Szakmary, 1990). Con esta prueba se han obtenido además resultados positivos con diversos mutágenos y una gran variedad de promutágenos (Würigler y Vogel, 1986).

Además de ser un sistema relativamente rápido, el número de células por organismo es elevado: 24,400 células para el protocolo que emplea células de las alas (Clements et al., 1988).

La duración de la etapa disponible para aplicar la prueba (fase larvaria) permite diseñar protocolos combinados que incluyan tratamientos consecutivos o bien combinaciones de éstos: crónico-agudo, agudo-crónico y mezclas. Lo anterior resulta importante si se busca establecer la existencia de sinergismo positivo (potenciación), o de sinergismo negativo (antagonismo) entre dos o más sustancias (Casarett, 1975).

Objetivo general:

"Determinar el efecto genotóxico y antimutagénico de la resina de plantas medicinales del Complejo "Raíz de Jalapa" empleando la prueba de mutación y recombinación somáticas de las células de las alas de *Drosophila melanogaster*".

Los objetivos particulares del presente trabajo son:

1. Analizar el potencial genotóxico de la resina de la raíz de *Ipomoea jalapa* mediante la prueba de recombinación somática en células de las alas de *Drosophila melanogaster*.
2. Determinar si la resina de *Ipomoea jalapa* tiene potencial antimutagénico sobre la genotoxicidad de la N-Nitroso dimetilamina (DMN) en células somáticas de las alas de *Drosophila melanogaster*.
3. Comparar el potencial genotóxico y antimutagénico de las resinas de las tres especies del género *Ipomoea*: *I. orizabensis*, *I. purga* e *I. jalapa* mediante la prueba de mutación y recombinación somáticas de *Drosophila melanogaster*.
4. Determinar el efecto genotóxico de una resina purificada (resina B) de la raíz de *Ipomoea orizabensis*.
5. Determinar el efecto antimutagénico de la resina de la raíz de *Ipomoea orizabensis* en contra de dos mutágenos de referencia (MMS y MMC) utilizando la prueba de mutación y recombinación somáticas de *Drosophila melanogaster*.

6. Comparar el potencial genotóxico y antimutagénico de la vitamina C y de la resina de *Ipomoea orizabensis* sobre la genotoxicidad de la N-Nitroso dimetilamina en células somáticas de *Drosophila melanogaster*.
7. Analizar el posible mecanismo de acción implicado en el efecto antimutagénico de la resina de *Ipomoea orizabensis*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Compuestos Químicos

N-Nitrosodimetilamina (DMN) [CAS 62-75-9], Vitamina C (ácido ascórbico) [CAS 585-68-2], Mitomicina C (MMC) [CAS 50-07-7], Tween 80 (polioxietileno-sorbitano monocoleato) [CAS 9005-65-6] de Sigma; Metilmetanosulfonato (MMS) [CAS 66-27-3] de Aldrich; Dimetil Sulfóxido (DMSO) [CAS 67-68-5], Sacarosa [CAS 57-50-1] de Baker; Celulosa microcristalina de Merck.

Los extractos (resinas) de la raíz de las especies del género *Ipomoea*: *I. orizabensis*, *I. purga*, *I. jalapa* y la resina B de *I. orizabensis* fueron amablemente proporcionadas por la Dra. Ma. Cristina Pérez Amador, del Laboratorio de Química de la Facultad de Ciencias de la UNAM y se obtuvieron mediante una extracción convencional ("forma oficial").

Concentraciones y forma de preparación de las soluciones de resina

En experimentos preliminares se seleccionaron las concentraciones de los mutágenos modelo (testigos positivos), DMN [925 ppm], MMS [1 mM] y MMC [0.625 mM], ya que a estas concentraciones se incrementa de manera significativa la frecuencia de manchas mutantes (variable de respuesta), en la prueba de mutación y recombinación somáticas de *Drosophila*.

Con respecto a las resinas, se seleccionaron las concentraciones más altas que no parecieron resultar tóxicas para los organismos expuestos en tratamientos preliminares; los valores seleccionados abarcaron de 50 hasta 6250 ppm. Al ser insoluble en agua y en otros disolventes, las resinas de *Ipomoea* se solubilizaron utilizando dimetilsulfóxido (DMSO) y Tween 80. La resina se colocó en DMSO y se agitó hasta disolverse, posteriormente se agregó Tween 80 y se volvió a agitar; por último, y gota a gota, se agregó el agua necesaria para realizar la solución y se agitó, hasta homogeneizar, la

concentración final del DMSO y Tween 80 fue del 1.5 y 1 % respectivamente. Para la resina B de *Ipomoea orizabensis* la concentración del DMSO se incrementó al 2 % y la del Tween 80 al 1.5 %. El Tween 80 le dio estabilidad a la solución, ya que al agregar el agua en ausencia de éste, la solución adquiría una coloración lechosa (se formaba una emulsión), que al poco tiempo se precipitaba, lo que se evitó con el uso del Tween 80.

Sistema de Cruzas

Se utilizaron dos líneas con marcadores fenotípicamente reconocibles:

- i) $f1r^3/In(3LR)TM3$, $ri\ p^o\ sep\ bx^{34e}\ e^s\ Ser$ (o de forma abreviada $f1r^3/TM3, Ser$)
- ii) mwh/mwh

El marcador $f1r^3$ (3-38.8) es codificado por un gen autosómico recesivo, letal en condición homocigótica, pero que resulta viable en mutantes somáticos. Para su mantenimiento se requiere del cromosoma balanceador $TM3, Ser$, un cromosoma especialmente contruido que tiene múltiples inversiones que generan arreglos sinápticos complejos que por recombinación provocan fragmentos acéntricos, dicéntricos y anillos acéntricos entre otras figuras, por lo que este cromosoma se utiliza para evitar la recuperación de arreglos producidos por recombinación; además, lleva la mutación letal dominante *Serratia* (*Ser*), que se manifiesta como una muesca en el borde de las alas, de manera que en esta línea sólo los organismos transheterocigotos $f1r^3/TM3, Ser$ son viables. En mutantes somáticos el $f1r^3$ altera la forma del tricoma, tiene expresividad variable por lo que va desde una mancha quitinosa sobre la superficie del ala, a la forma de una flama, de donde recibe su nombre (García Bellido y Dapena, 1974; Lindsley y Zimm, 1990).

El marcador *mwh* (multiple wing hair) (3-0.0) es autosómico recesivo y provoca la producción de tricomas múltiples (de 2 a 14 o más) por célula, comparado con uno por célula en las moscas de tipo silvestre (Lindsley y Grell, 1968; Lindsley y Zimm, 1990).

La crucea progenitora se realizó con hembras vírgenes *flr³/In(3LR)TM3, ri p^o sep bx³⁴ e^o Ser* (o de forma abreviada *flr³/TM3, Ser*) de 72 ± 4 horas de edad y machos *mwh/mwh* de 48 ± 4 de edad (para una descripción detallada de los marcadores consultar Lindsley y Grell, 1968; García Bellido y Dapena, 1974; Lindsley y Zimm, 1990).

Las larvas trasheterocigóticas *flr³/mwh* conforman la mitad de la progenie, la otra mitad consiste en larvas *TM3, Ser/mwh*. No existen diferencias evidentes entre los dos tipos de larvas, por lo que se tratan juntas pero, después de la metamorfosis, las moscas libres de inversión: + *flr³/mwh* +, tienen alas silvestres y pueden distinguirse claramente de las moscas adultas portadoras del cromosoma balanceador y en consecuencia, de múltiples inversiones: *TM3, Ser/mwh*, que presentan alas con muescas en los bordes (Fig. 13). Durante la metamorfosis las células que constituyen la hoja del ala forman un proceso unicelular (pelo o tricoma), de manera que la cuantificación de pelos o tricomas es equivalente con las células que les dieron origen (Fig. 12).

Las alteraciones genéticas causan fenotipos reconocibles en las células de las alas, de manera que en un contexto de tricomas silvestres, pueden observarse tricomas que expresan el fenotipo *flr³, mwh* o ambos. La recombinación entre los marcadores *mwh* y *flr³* genera manchas sencillas *mwh*. Las manchas *mwh* también pueden originarse por otros eventos genéticos, tales como delección, mutación puntual y no disyunción (Graf et al., 1984; Becker et al., 1976). Por otro lado, la recombinación mitótica entre *flr³* y el centrómero produce

P



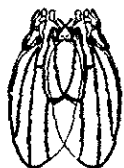
♀ *fir*³/TM3,Ser

X



♂ *mwh*/*mwh*

F₁



*fir*³/+ *mwh*

Transheterocigas
Alas silvestres



TM3,Ser/+ *mwh*

Portadoras del balanceador
Alas Serrata

Fig. 13 Origen de las moscas libres de inversión (*fir*³/+ *mwh*) y portadoras de inversión (TM3,Ser/+ *mwh*).

manchas gemelas *mwh-flr*³, por su origen, este tipo de manchas son indicadoras de recombinación (Fig. 14). En general, el tamaño de un clon es mayor cuando se induce en larvas jóvenes (24 a 48 horas), y de menor tamaño si se producen en larvas de mayor edad (72 o más horas); ya que mientras más avanza la edad de la larva se tienen más células blanco que participarán en menos divisiones mitóticas (García Bellido y Merriam, 1971; Szabad et al., 1983) (Fig. 15).

Procedimiento Experimental

Para la realización de este trabajo se desarrollaron dos tipos de protocolos con el fin de determinar la actividad genotóxica de las resinas de las especies del género *Ipomoea* y su potencial antimutagénico cuando se administran antes o después de los controles positivos (mutágenos de referencia). La figura 16 muestra un esquema de los dos protocolos. En el primero, las larvas se expusieron por 48 h a la resina (tratamiento crónico), y posteriormente al mutágeno de referencia por 6 h (tratamiento agudo). En el segundo, se administró primero el tratamiento agudo con el mutágeno por 6 horas y, posteriormente el tratamiento crónico con la resina durante 48 h. Para evaluar si las resinas son genotóxicas se utilizaron los mismos protocolos pero, se sustituyó a los mutágenos de referencia por sacarosa al 5%.

Tratamientos

Para obtener larvas de edad similar, 72 horas después de realizar la cruce se colectaron huevecillos al transferir a los progenitores a medio fresco por 8 h. A continuación se indica el procedimiento seguido en cada uno de los protocolos.

1) A frascos que contenían las larvas de 24 ± 4 hr de edad se les agregó 1 ml de la solución de las resinas, que se distribuyó sobre la superficie del medio de cultivo

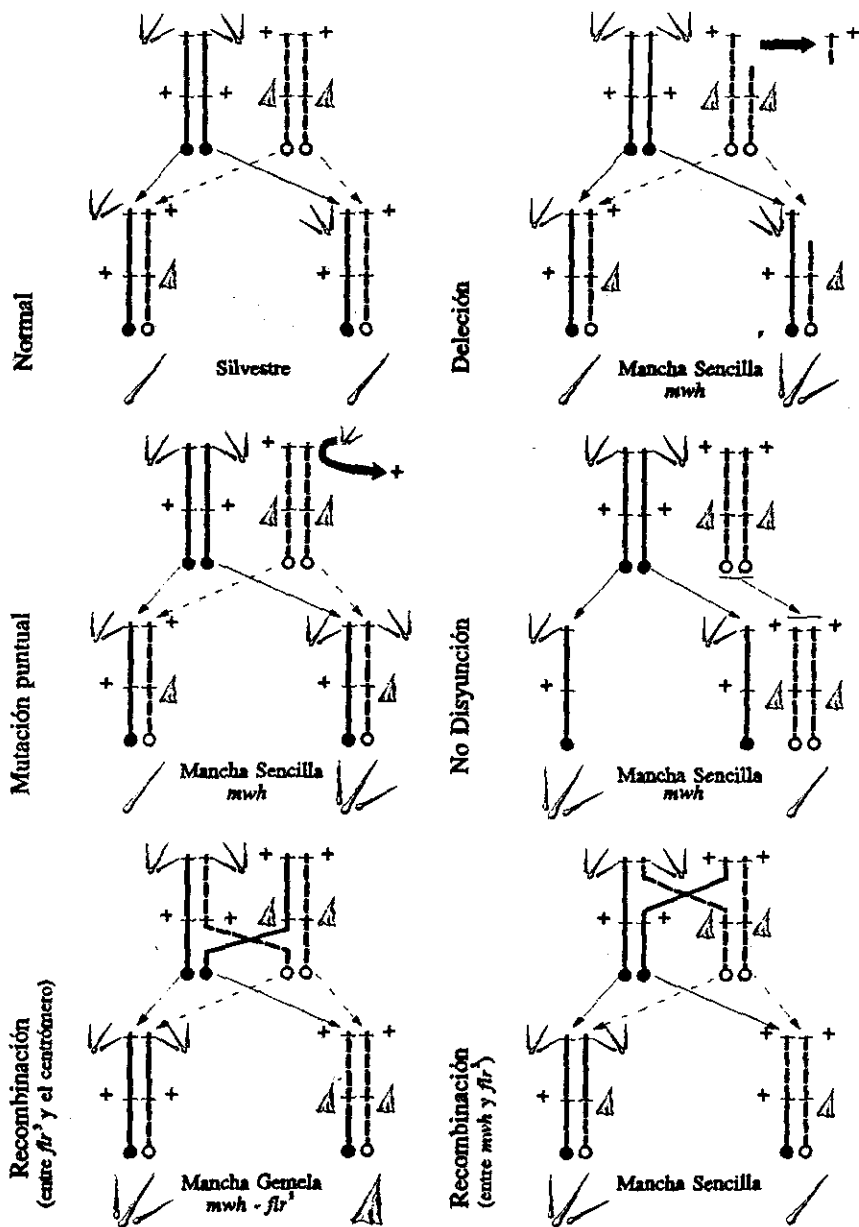


Fig. 14 Eventos genéticos y tipo de mancha que detecta la prueba de mutación y recombinación somáticas (Modificado de Graf *et al* 1988).

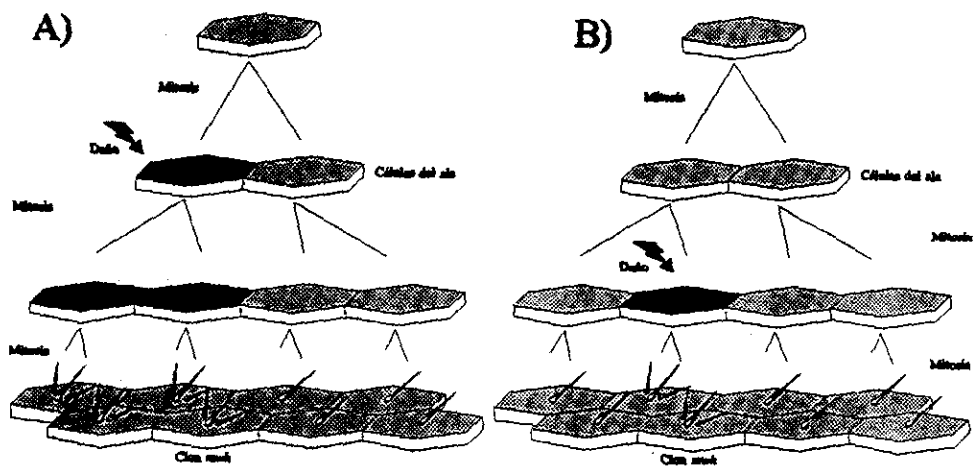
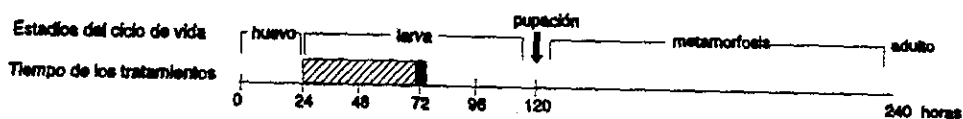
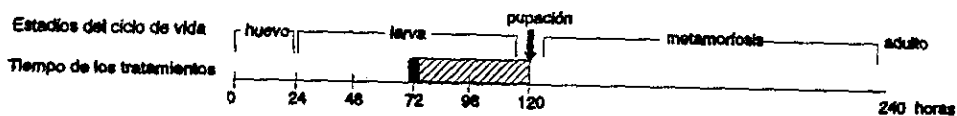


Fig. 15 A) mancha grande producida en el desarrollo temprano de *Drosophila melanogaster*
 B) mancha chica producida en el desarrollo tardío de *Drosophila melanogaster*.

Protocolo 1. Exposición: 48 X 6 hrs.



Protocolo 2. Exposición: 6 X 48 hrs.



Tratamientos:

■ Agudo: Mutágenos de referencia (DMN, MMS y MMC) o sacarosa al 5%.

▨ Crónico: resinas de *Ipomoea* (*I. orizabensis*, *I. purga*, *I. jalapa*) y la resina B de *I. orizabensis*), vitamina C.

Fig. 16 Esquema de protocolos utilizados

(tratamiento crónico), transcurridas 48 horas se extrajeron las larvas de acuerdo con el procedimiento de Nöthinger (1970), que consiste en separar las larvas del medio mediante una solución concentrada de sacarosa al 20 %, posteriormente la solución se vertió en un embudo de separación, del que se recuperaron las larvas por flotación, utilizando una malla de nylon, se enjuagaron en agua corriente, se colocaron en un tubo homeopático de 10 ml de capacidad, al cual se le fijó en un extremo una gasa de nylon, y un tapón de hule espuma en el otro; posteriormente éste se introdujo en un vaso de precipitado de 10 ml conteniendo 0.06 g de celulosa microcristalina en polvo y 0.5 ml de la solución a tratar (mutágeno de referencia o sacarosa al 5 %) por 6 horas (tratamiento agudo), después los tubos homeopáticos se retiraron del vaso, las larvas se enjuagaron en agua corriente y se colocaron en frascos con medio de cultivo fresco para que continuaran su desarrollo. Así la exposición total fue de 48 X 6 horas.

2) Larvas de 72 ± 4 horas, extraídas como se indicó anteriormente, se trataron en forma aguda con el mutágeno de referencia, después de 6 h se enjuagaron con agua corriente y se colocaron en frascos con medio fresco sobre el que se agregó 1 ml de la solución de resina (tratamiento crónico), y se dejó que continuaran su desarrollo como se indicó en el primer protocolo, para una exposición total de 6 X 48 horas. De manera paralela se corrieron los testigos negativos concurrentes.

El antioxidante, vitamina C se probó bajo los mismos criterios de experimentación y utilizando ambos protocolos. Como disolvente se utilizó agua destilada y se probaron 100, 1000 y 2500 ppm de vitamina C por 48 h y el mutágeno utilizado fue la DMN. Para cada lote se realizó un experimento y una repetición.

Análisis de las alas

Una vez obtenidas las moscas adultas se sacrificaron por exceso de anestesia (éter) y se fijaron en etanol al 70 %. Las alas se separaron con la ayuda de unas pinzas de relojero y se montaron en portaobjetos utilizando solución Fauré (Graf et al., 1984). En cada laminilla se montaron 40 alas, 20 de hembras y 20 de machos y se analizó la superficie ventral y dorsal de la hoja de cada ala con un microscopio óptico, a un aumento de 40X. Cada mancha se registró de acuerdo a la sección del ala en la que se localizaba (García Bellido y Merriam, 1971; Graf et al., 1984); el número de células que la formaba; y, el fenotipo de ésta: *mwh*, *flr* o ambos (Fig. 17).

Análisis Estadístico

Los datos se procesaron con la ayuda del programa de cómputo SMART (Würgler 1988 no publicado), y el procedimiento de decisión múltiple de Frei y Würgler (1988), con un nivel de significancia del 5 %. La decisión se basa en el contraste de dos hipótesis.

La hipótesis nula (H_0), señala, que no hay diferencias en la frecuencia de mutación entre las series testigo y las tratadas. Si en estas últimas, la frecuencia de mutación se incrementa de manera significativa, la H_0 se rechaza. Por otro lado, la hipótesis alternativa (H_a), postula, que en las series tratadas hay un incremento estadístico igual a " m " veces la frecuencia basal. Dado que la frecuencia de manchas sencillas de menos de tres células y de manchas totales, es mucho mayor que la frecuencia de manchas simples, de más de tres células y la de manchas gemelas, se utiliza $m = 2$ para las primeras y $m = 5$ para las últimas.

La aplicación de éste análisis estadístico puede llevar a cuatro tipos de resultados: si no se rechaza la H_0 y se rechaza la H_a el resultado es negativo (-), por el contrario, si se

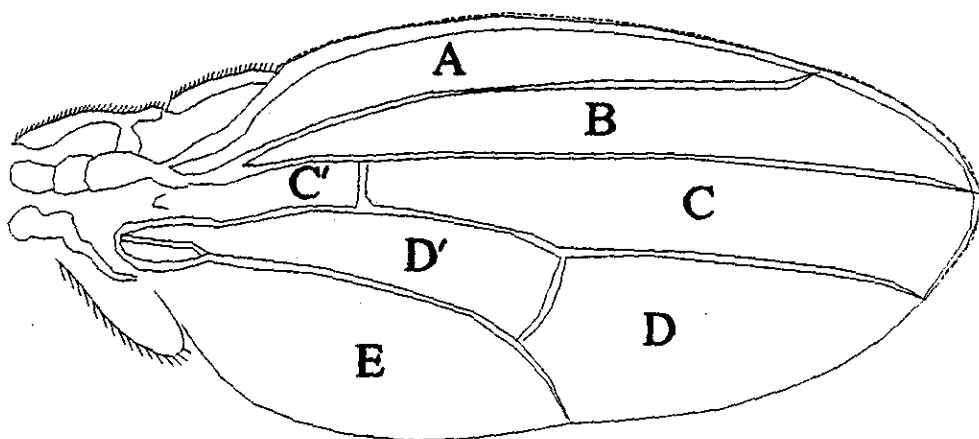


Fig. 17 Sectores del ala de *Drosophila melanogaster* utilizados en la prueba de mutación y recombinación somáticas.

rechaza la H_0 y no se rechaza la H_a , el resultado es positivo (+); por otro lado, si las dos hipótesis se rechazan, el resultado se considera débil positivo ($d+$), y si ambas no se rechazan, el resultado es indeterminado (i) (Tabla VII).

En algunas ocasiones surgen células con dos tricomas, esto puede deberse a alteraciones en la diferenciación celular que no corresponden a expresiones típicas de *mwh* por lo que, para evitar errores en la clasificación, las manchas de 2 pelos únicamente se cuantificaron como expresiones *mwh* sólo cuando formaban parte de una mancha en la que había al menos una célula *mwh*, con más de tres pelos (Graf et al., 1984). Las manchas grandes tienen una forma elongada en la dirección del eje longitudinal del ala y pueden presentar forma de Z. Aunque la mayoría de las manchas son continuas, en ocasiones se pueden presentar hileras de tricomas silvestres entre una mancha, probablemente debido a la separación parcial de las células del clon durante el desarrollo por presiones tisulares o movimientos celulares independientes (García Bellido y Merriam, 1971). Para la valoración de este tipo de manchas y de acuerdo con los criterios utilizados por Graf et al. (1984) se contaron como manchas independientes aquellas que se encontraban separadas por tres o más hileras de tricomas normales.

Prueba U de Mann-Whitney

Es una prueba no paramétrica, que se basa en la comparación de los rangos en los que se presentan las observaciones, se utiliza mas información que la prueba de la mediana y esta prueba se fundamenta en las siguientes suposiciones:

i) Los dos tratamientos, de tamaños n y m , respectivamente, que se utilizan para el análisis son extraídos independientemente de sus poblaciones respectivas.

Tabla VII. Diagnóstico estadístico del procedimiento de decisión múltiple de Frei y Würzler (1988).

HIPOTESIS	no se rechaza H _A	Se rechaza H _A
no se rechaza H ₀	Indeterminado	Negativo
Se rechaza H ₀	Positivo	Débil Positivo

ii) La escala de medición es por lo menos ordinal.

iii) Las poblaciones son diferentes sólo en lo que respecta a sus medianas.

La prueba consiste en el contraste de las siguientes hipótesis, lo que depende de la información que se tenga con respecto al efecto del tratamiento bajo análisis:

1) Hipótesis nula (H_0): las 2 poblaciones tienen medianas iguales H_0 : A y B tienen la misma distribución.

2) H_A : Las poblaciones no tienen medianas iguales, n_1 es diferente de n_2 .

3) H_A : La mediana de la población P > que la mediana de la población Z.

4) H_A : La mediana de la población P < que la mediana de la población Z.

Esta prueba es útil para analizar la dispersión en la distribución del número de manchas por mosca y el número de células por mancha; la distribución se modificó cuando se encontraron diferencias significativas a una $P < 0.05$

En la figura 18 se muestran un resumen de la metodología.

Cruza: ♀♀ flr³/ TM3, Ser X ♂♂ mwh/mwh

Edad de las larvas y duración: Protocolo 1 : 48 x 6
2 : 6 x 48

Compuesto a probar: Resina: *I. orizabensis* [2500, 3750, 4375, 5000 y 6250 ppm]
I. jalapa [250, 500, 2500 y 5000 ppm]
I. purga [50, 100, 250 y 500 ppm]
B de *I. orizabensis* [250, 500, 2500 y 5000 ppm]

Disolventes: DMSO [1.5 %] + Tween 80 [1.0 %]
Vitamina C [100, 1000 y 2500 ppm]

Disolvente: agua destilada

Control positivo: N-nitroso-dimetilamina, DMN [925 ppm]
Metilmetano sulfonato, MMS [1mM]
Mitomicina C [0.625 mM] } Disolvente: sacarosa [5 %]

Tamaño de muestra: 120 alas

Repeticiones: 2

Registro de datos: las alas se revisaron a 40X y se contabilizó el número,
tamaño y tipo de mancha

Análisis estadístico: según Frei y Würigler, 1988
U de Mann-Whitney

Fig. 18 Resumen de la metodología.

RESULTADOS

Los resultados obtenidos en cada repetición fueron comparados, y al no encontrar diferencias entre ellos, se procedió a sumarlos con el fin de obtener el tamaño de muestra propuesto.

Mutagénesis

Ipomoea jalapa

En las tablas VIII y IX, se presentan los resultados obtenidos en los tratamientos con *I. jalapa*. La resina administrada a larvas de 24 (48 X 6 h) o de 72 (6 X 48 h) no modificó la frecuencia de manchas (figuras 19a y 20a), aunque en general, en las larvas tratadas a las 24 h de edad la frecuencia de manchas fue menor en las series experimentales. De igual manera, no alteró la dispersión del número de células por mancha (figuras 19b y 20b) y la dispersión del número de manchas por mosca (figuras 19c y 20c), con respecto a sus testigos negativos.

Los resultados de las especies de *I. purga* y de *I. orizabensis* fueron tomados de García et al., 1993 y de Muñoz-Moya, 1994, para hacer las comparaciones correspondientes ya que estas plantas pertenecen al "complejo jalapa".

Ipomoea purga

No se reportan diferencias significativas entre las las moscas tratadas con la resina de *I. purga* y las del lote testigo, en la frecuencia de manchas por ala recobradas en ambos tratamientos (figuras 21a y 22a). En las larvas tratadas a las 72 h de edad, la frecuencia de manchas fue menor en las series experimentales con concentraciones de 100 a 500 ppm de la resina. La dispersión de la distribución del número de células por mancha y de la distribución del número de manchas

por mosca no se modificó en las larvas expuestas a las 24 h de edad (figura 21b y c), mientras que en las tratadas a las 72 h se encontró más dispersión que en la serie testigo, sin embargo ésta no alcanzó a ser significativa (figuras 22b y c) (García et al., 1993).

Ipomoea orizabensis

No se reportan diferencias en la frecuencia de manchas en las larvas tratadas a primer o tercer estadio (figuras 23a y 24a). En las larvas tratadas en el primer estadio, la dispersión en la distribución del número de células por mancha fue menor en las series experimentales a partir de 4375 ppm, mientras que se mantuvo sin cambios en las larvas tratadas en el tercer estadio (figuras 23b y 24b). La distribución del número de manchas por mosca no se modificó en ninguno de los tratamientos (figuras 23c y 24c) (Muñoz-Moya, 1994).

Comparación de las tres especies de *Ipomoea*.

En la figura 25 se compara la frecuencia de manchas totales obtenidas en los tratamientos con cada una de las resinas. Aunque como se indicó en ningún caso las frecuencias se modificaron de manera significativa, en las larvas tratadas en el primer estadio, la resina de *I. purga* produjo frecuencias ligeramente mayores, mientras que lo contrario se observó para los tratamientos con la resina de *I. orizabensis* (figura 25a). En las larvas tratadas en el tercer estadio, las tres resinas tuvieron un efecto similar, aunque las frecuencias menores correspondieron nuevamente a los tratamientos con *I. orizabensis* (figura 25b). Los resultados mostrados sugieren que la edad de la larva no influye de manera determinante en la respuesta obtenida.

Antimutagénesis

Ipomoea jalapa

La DMN es un mutágeno que modifica en un orden de magnitud la frecuencia de manchas por ala, de 0.30 (valor promedio) en los testigos negativos a valores mayores a 3.00. Cuando se administró la DMN después que la resina de *I. jalapa* (48 X 6) (Tabla X), se observó un incremento significativo en la frecuencia de manchas inducidas por el mutágeno en las concentraciones de 250, 500 y 2500 ppm de la resina. En la concentración más alta de la resina (5000 ppm) el incremento sólo fue significativo para la frecuencia de manchas grandes (figura 26a). La dispersión en la distribución del número de células por mancha fue un poco mayor pero no significativa (Figura 26b), mientras que la dispersión en la distribución del número de manchas por mosca fue mayor en todas las concentraciones de la resina y se desplazó hacia valores mayores (figura 26c). En contraste, al administrar la DMN previo a la resina no se observaron diferencias en la frecuencia de manchas inducidas por la DMN en presencia o ausencia de la resina (Tabla XI y figura 27a). La dispersión en la distribución del número de células por mancha inducida por la DMN, tampoco fueron modificadas por la presencia de la resina de *I. jalapa* (figura 27b); por otro lado la dispersión de la distribución en el número de manchas por mosca se modificó en las concentraciones de 2500 y 5000 ppm (figura 27c) ($P < 0.05$).

Ipomoea purga

La exposición a la resina de *I. purga* seguida por el tratamiento con la DMN (48 X 6 h), mostró reducción en la frecuencia de manchas chicas en las concentraciones de 100 y 250 ppm de la resina; el resultado fue débil positivo para la frecuencia de manchas totales a 100 ppm (figura 28a) ($P < 0.05$); la dispersión en la distribución del número de células por

mancha sólo se modificó a 50 ppm (figura 28b); la dispersión de la distribución del número de manchas por mosca se modificó a partir de 100 ppm (figura 28c). En la figura 29 se muestran los resultados del tratamiento con la DMN seguido por la exposición a la resina de *I. purga* (6 X 48 h). Los tres aspectos evaluados: frecuencia de manchas, dispersión en la distribución de células por mancha y de manchas por mosca, no se modificaron por la presencia de la resina en las concentraciones probadas (figura 29a-c) García et al., 1993).

Ipomoea orizabensis

Las larvas tratadas con la resina de *I. orizabensis*, seguida por el tratamiento con la DMN (48 X 6 h), mostraron cuando adultas frecuencias de manchas por ala significativamente menores a la inducida por el tratamiento con la DMN ($P < 0.05$), solamente a 2500 y 3750 ppm el resultado fue débil positivo para manchas simples grandes, y gemelas (figura 30a); la dispersión en la distribución del número de células por mancha fue menor a la inducida por la DMN (figura 30b); finalmente, la distribución del número de manchas por mosca fue menor y dependiente de la concentración de la resina ($P < 0.05$) (figura 30c). En la figura 31 se muestran los resultados obtenidos al invertir el orden de los tratamientos (6 X 48 h). La frecuencia de manchas simples chicas y manchas totales disminuyó de manera significativa conforme se incrementó la concentración de la resina ($P < 0.05$). Para manchas simples grandes (2500 y 3500 ppm), la diferencia en relación con la DMN, fué débil positiva; a concentraciones mayores se encontraron frecuencias menores ($P < 0.05$). Para las manchas gemelas, la frecuencia obtenida en el lote con la DMN y 2500 ppm de la resina es similar a la obtenida sólo con la DMN; en el lote con 4375 ppm, la respuesta fue débil positiva; En todos los demás lotes con la DMN y la resina, las frecuencias son

significativamente menores que la frecuencia del lote testigo (figura 31a). La dispersión en la distribución del número de células por mancha fue significativamente menor (figura 31b). De igual manera, la dispersión en la distribución del número de manchas por mosca se modificó encontrándose un número cada vez mayor de moscas que presentaban pocas o ninguna mancha en sus alas ($P < 0.05$) (figura 31c) (Muñoz-Moya, 1994).

Comparación de las tres especies de *Ipomoea*.

Al comparar la interacción de las tres resinas y la DMN, se encontró efecto antimutagénico en la resina obtenida de *Ipomoea orizabensis*, ya que reduce, dependiente de la concentración, la frecuencia de manchas de manera significativa ($P < 0.05$) (figura 32). Este efecto se presenta tanto cuando se administra antes como después que el mutágeno.

Resina B de *Ipomoea orizabensis*

La resina purificada de *Ipomoea orizabensis* que se encuentra en mayor abundancia (resina B) fué probada siguiendo la misma metodología para determinar si en esta fracción se encontraba una actividad de protección similar.

Los resultados mostrados en las tablas XII y XIII indicaron que la resina B no mostró ser genotóxica para larvas de primer y tercer estadio, ya que no modificó la frecuencia de manchas con respecto a sus testigos negativos concurrentes (figuras 33a y 34a). En las figuras 33b - c y 34b - c, se observa que la dispersión en la distribución del número de células por mancha y del número de manchas por mosca no se modificó en ninguno de los dos tratamientos con la resina B.

En la tabla XIV y la figura 35a se muestran los resultados del tratamiento con la resina B de *I. orizabensis* seguido por el tratamiento agudo con la DMN. La resina disminuyó de manera significativa la frecuencia de manchas chicas en todas las

concentraciones utilizadas, el efecto fué débil positivo para manchas grandes en la concentración de 5000 ppm y para manchas totales a concentraciones menores a 5000 ppm y significativo a ésta. No se observó efecto en la frecuencia de manchas gemelas. De igual manera se modificó la dispersión de la distribución de la frecuencia de células por mancha y de manchas por mosca en todas las concentraciones (figuras 35b - c).

Al invertir el orden de los tratamientos (6 X 48 h) la resina disminuyó con un diagnóstico débil positivo la frecuencia de manchas chicas (250 y 500 ppm) y el efecto fue significativo a 5000 ppm ($P < 0.05$). La frecuencia de manchas grandes y de gemelas se redujo en los tratamientos con 2500 ppm. Con respecto a la suma de las manchas sólo se obtuvo un diagnóstico de reducción débil positivo en los tratamientos con 2500 y 5000 ppm. (tabla XV y Fig. 36a). La dispersión en la distribución del número de células por mancha y la distribución del número de manchas por mosca fue menor en los tratamientos con 2500 y 5000 ppm de la resina (figura 36b y c).

***Ipomoea orizabensis* y otros mutágenos de referencia**

MMS

La tabla XVI muestra los resultados recobrados al tratar a larvas de primer estadio con la resina (no purificada) obtenida de *I. orizabensis* y tratadas después con el MMS (48 X 6 h). La presencia de la resina disminuyó de manera significativa la frecuencia de manchas chicas en las todas las concentraciones empleadas, el efecto fué débil positivo para manchas grandes y positivo para manchas gemelas a 2500, 5000 y 6250 ppm de la resina. Al sumar todas las manchas el efecto fue débil positivo para 2500 y 3750 y positivo para el resto de las concentraciones ($P < 0.05$) (figura 37a); de igual manera se modificó la dispersión de las distribuciones del número de células por mancha y del número de células por mosca en todas

las concentraciones (figuras 37b - c). ($P < 0.05$).

De igual manera la resina de *I. orizabensis*, cuando se administró después que el MMS (6 X 48 h), disminuyó de manera significativa la frecuencia de manchas chicas y totales en todas las concentraciones utilizadas, el efecto fué débil positivo para manchas grandes en las concentraciones de 2500, 5000 y 6250 ppm y positivo para manchas gemelas a 3750 y 4375 ppm (tabla XVII y figura 38a). También se modificó de manera significativa la dispersión de la distribución del número de células por mancha y del número de manchas por mosca ($P < 0.05$) (figuras 38b y c).

MMC

Como en los tratamientos anteriores, la resina de *I. orizabensis* disminuyó de manera significativa la frecuencia de manchas chicas y totales cuando se administró previo y posterior al tratamiento de la MMC (48 X 6 h y 6 X 48 h). El efecto fué más marcado para manchas grandes en larvas de primer estadio y en ambos tratamientos no se observó efecto en la frecuencia de manchas gemelas (tablas XVIII y XIX, figuras 39a y 40a); la dispersión en la distribución del número de células por mancha, fué menor en todas las concentraciones (figuras 39b y 40b) ($P < 0.05$). La dispersión en la distribución del número de manchas por mosca fue también menor ($P < 0.05$) y conforme se incrementó la concentración probada se recobró un número mayor de moscas con pocas o ninguna mancha en sus alas (figuras 39c y 40c).

En la figura 41 presentan comparativamente la frecuencia de manchas por ala, la distribución del número de células por mancha y la distribución del número de manchas por mosca inducidas por los mutágenos utilizados: MMS, MMC y DMN. El último compuesto es el que tiene la mayor actividad genotóxica, lo que indica la capacidad de respuesta del sistema de

Drosophila las diferentes especies químicas, ante las cuales el efecto protector de la resina de *I. orizabensis* resultó positivo.

Vitamina C

Los resultados obtenidos al evaluar el efecto genotóxico de la Vitamina C se muestran en la tablas XX, XXI y la figuras 42 y 43, los datos recobrados mostraron que la vitamina C no es genotóxica para larvas de primer y de tercer estadio ya que no se registró modificación en la frecuencia de manchas del testigo negativo, así como en las distribuciones del número de células por mancha y del número de manchas por mosca.

En la tabla XXII y en la figura 44a se muestra que la Vitamina C, cuando se administra primero que el mutágeno de referencia DMN (48 X 6 h), reduce de manera débil positiva sólo la frecuencia de manchas chicas inducidas por el mutágeno y no tiene efecto sobre los otros tipos de mancha; la frecuencia de distribución del número de células por mancha no se modificó en ninguna de las concentraciones (figura 44b); sólo se observó menor dispersión en la distribución del número de manchas por mosca en las concentraciones de 1000 y 2500 ppm ($p < 0.05$) (figura 44c).

Cuando se administró primero la DMN y después la Vitamina C la frecuencia de manchas chicas se redujo de manera débil positiva a 100 ppm y significativamente a 1000 y 2500 ppm; la reducción fué débil positiva a 2500 ppm para manchas gemelas. Al sumar todas las manchas, el efecto se mantuvo débil positivo para manchas totales a 1000 y 2500 ppm (Tabla XXIII y figura 45a); la dispersión en la distribución del número de células por mancha fue menor a 1000 y 2500 ppm; finalmente, la dispersión en la distribución del número de manchas por mosca fue menor y desplazada a valores menores en todas las concentraciones probadas (figura 45b y c).

Tabla VIII. Frecuencia de manchas inducidas con diferentes concentraciones de la resina de *Ipomoea jalapa* en células del ala de *Drosophila melanogaster*.
Exposición: 48 X 6.

Compuesto	Núm. de alas	Manchas				Div. células Prom.	Frec. 10^{-5}
		Simples chicas m=2	Simples Grandes m=5	Gemelas m=5	Totales m=2		
Testigo Negativo*	120	27 (0.22)	5 (0.04)	6 (0.05)	38 (0.32)	1.79	1.3
[+Sac**							
250	120	27 (0.22)	4 (0.03)	1 (0.01)	32 (0.27)	1.55	1.1
500	120	20 (0.17)	5 (0.04)	1 (0.01)	26 (0.22)	1.96	0.9
2500	120	21 (0.17)	8 (0.07)	3 (0.03)	32 (0.27)	2.34	1.1
5000	120	16 (0.13)	11 (0.09)	1 (0.01)	28 (0.23)	3.21	1.0

Análisis estadístico con el programa SMART (Würgler, no publicado), $P = 0.05$.

*. DMSO [1.5 %] + Tween 80 [1 %].

**., Tratamiento crónico: resina [ppm] y tratamiento agudo con sacarosa al 5%.

Tabla IX. Frecuencia de manchas inducidas con diferentes concentraciones de la resina de *Ipomoea jalapa* en células del ala de *Drosophila melanogaster*.
Exposición: 6 X 48.

Compuesto	Núm. de alas	Manchas				Div. célula res Prom.	Frec. 10 ⁻³
		Simples chicas m=2	Simples Grandes m=5	Gemelas m=5	Totales m=2		
Testigo Negativo*	118	24 (0.20)	6 (0.05)	1 (0.01)	31 (0.26)	1.97	1.1
Sac+ []**							
250	116	20 (0.17)	4 (0.03)	2 (0.02)	26 (0.22)	1.92	0.9
500	120	29 (0.24)	4 (0.03)	0 (0.00)	33 (0.28)	1.85	1.1
2500	120	27 (0.22)	5 (0.04)	2 (0.02)	34 (0.28)	1.91	1.2
5000	120	20 (0.17)	5 (0.04)	3 (0.03)	28 (0.23)	2.04	1.0

Análisis estadístico con el programa SMART (Würgler, no publicado), P = 0.05.

*. DMSO [1.5 %] + Tween 80 [1 %].

** Tratamiento agudo con sacarosa al 5% y tratamiento crónico: resina [ppm].

Tabla X. Frecuencia de manchas inducidas por DMSO + Tween + DMN y diferentes concentraciones de la resina de *Ipomoea jalapa* en células del ala de *Drosophila melanogaster*.
Exposición: 48 X 6.

Compuesto	Núm. de alas	Manchas				Div. celulas Prom.	Frec. 10 ⁻⁵
		Simples chicas m=2	Simples Grandes m=5	Gemelas m=5	Totales m=2		
Testigo Positivo*	110	183 (1.62)	423 (3.88)	85 (0.78)	691 (6.34)	3.21	19.8
[]+DMN							
250	100	562 + (5.62)	689 d+ (6.89)	244 d+ (2.44)	1495 + (14.95)	2.72	48.7
500	120	475 + (3.99)	914 d+ (7.68)	294 d+ (2.47)	1638 + (14.14)	2.96	43.1
2500	120	407 + (3.39)	799 d+ (6.66)	249 d+ (2.08)	1455 + (12.12)	2.96	37.5
5000	120	192 - (1.60)	541 - (4.51)	129 d+ (1.08)	862 - (7.18)	3.35	23.8

Análisis estadístico con el programa SMART (Würgler, no publicado): +, positivo; d+, débil positivo; -, negativo; P = 0.05.

* , DMSO [1.5 %] + Tween 80 [1.5 %] + DMN [925 ppm].

Tabla XI. Frecuencia de manchas inducidas por DMN + DMSO + Tween y diferentes concentraciones de la resina de *Ipomoea jalapa* en células del ala de *Drosophila melanogaster*.
Exposición: 6 X 48.

Compuesto	Núm. de alas	Manchas				Div. celulas Prom.	Frec. 10 ⁻⁵
		Simples chicas m=2	Simples Grandes m=5	Gemelas m=5	Totales m=2		
Testigo Positivo	120	231 (1.92)	307 (2.56)	73 (0.61)	611 (5.09)	3.04	17.0
DMN+ []							
250	120	199 - (1.66)	303 - (2.53)	67 - (0.56)	569 - (4.74)	3.00	15.2
500	120	173 - (1.44)	303 - (2.75)	63 - (0.52)	566 - (4.72)	3.16	15.3
2500	120	181 - (1.51)	300 - (2.50)	59 - (0.49)	540 - (4.50)	3.27	14.2
5000	118	175 - (1.48)	328 - (2.78)	66 - (0.56)	569 - (4.82)	3.33	16.1

Análisis estadístico con el programa SMART (Würgler, no publicado): - negativo; P = 0.05.

*, DMN [925 ppm] + DMSO [1.5 %] + Tween 80 [1 %].

Tabla XII. Frecuencia de manchas inducidas con diferentes concentraciones de la resina B de *Ipomoea orizabensis* en células del ala de *Drosophila melanogaster*.
Exposición: 48 X 6.

Compuesto	Núm. de alas	Manchas				Div. celulares Prom.	Frec. 10 ⁻⁵
		Simples chicas m=2	Simples Grandes m=5	Gemelas m=5	Totales m=2		
Testigo Negativo	120	28 (0.23)	7 (0.06)	0 (0.00)	35 (0.29)	1.91	1.2
[]+Sac**							
250	120	30 (0.25)	4 (0.03)	0 (0.00)	34 (0.28)	1.50	1.2
500	120	21 (0.17)	13 (0.11)	0 (0.00)	34 (0.28)	2.81	1.1
2500	120	24 (0.20)	9 (0.08)	1 (0.01)	34 (0.28)	2.00	1.1
5000	120	26 (0.22)	7 (0.06)	3 (0.03)	36 (0.30)	2.00	1.2

Análisis estadístico con el programa SMART (Würgler, no publicado), P = 0.05.

*, DMSO [2.0 %] + Tween 80 [1.5 %].

** , Tratamiento crónico: resina [ppm] y tratamiento agudo con sacarosa al 5%.

Tabla XIII. Frecuencia de manchas inducidas con diferentes concentraciones de la resina B de *Ipomoea orizabensis* en células del ala de *Drosophila melanogaster*.
Exposición: 6 X 48.

Compuesto	Núm. de alas	Manchas				Div. celulas Prom.	Frec. 10 ⁻³
		Simples chicas m=2	Simples Grandes m=5	Gemelas m=5	Totales m=2		
Testigo Negativo*	120	21 (0.17)	7 (0.06)	2 (0.02)	30 (0.25)	2.17	1.0
Sac+[]**							
250	120	28 (0.23)	5 (0.04)	1 (0.01)	34 (0.28)	1.97	1.1
500	120	22 (0.18)	6 (0.05)	2 (0.02)	30 (0.25)	2.13	1.0
2500	120	20 (0.17)	8 (0.07)	1 (0.01)	29 (0.24)	2.37	0.9
5000	120	26 (0.22)	7 (0.06)	3 (0.03)	36 (0.30)	2.00	1.2

Análisis estadístico con el programa SMART (Würgler, no publicado), P = 0.05.

*. DMSO [2.0 %] + Tween 80 [1.5 %].

** . Tratamiento agudo con sacarosa al 5% y tratamiento crónico: resina [ppm].

Tabla XIV. Frecuencia de manchas inducidas por DMSO + Tween + DMN y diferentes concentraciones de la resina B de *Ipomoea orizabensis* en células del ala de *Drosophila melanogaster*.
Exposición: 48 X 6.

Compuesto	Núm. de alas	Manchas				Div. celulas Prom.	Frec. 10 ³
		Simples chicas m=2	Simples Grandes m=5	Gemelas m=5	Totales m=2		
Testigo Positivo	120	117 (0.98)	202 (1.68)	17 (0.14)	336 (2.80)	3.39	9.8
[]+DMN							
250	120	50 + (0.42)	164 - (1.37)	13 - (0.11)	227 d+ (1.89)	4.23	6.6
500	68	20 + (0.29)	96 - (1.41)	6 - (0.09)	122 d+ (1.79)	4.55	5.9
2500	120	49 + (0.41)	197 - (1.64)	16 - (0.13)	262 d+ (2.18)	4.15	7.2
5000	120	58 + (0.48)	135 d+ (1.12)	13 - (0.11)	206 + (1.72)	4.00	5.8

Análisis estadístico con el programa SMART (Würgler, no publicado): +, positivo; d+, débil positivo; -, negativo; P = 0.05.

*, DMSO [2.0 %] + Tween 80 [1.5 %] + DMN [925 ppm].

Tabla XV. Frecuencia de manchas inducidas por DMN + DMSO + Tween y diferentes concentraciones de la resina B de *Ipomoea orizabensis* en células del ala de *Drosophila melanogaster*.
Exposición: 6 X 48.

Compuesto	Núm. de alas	Manchas				Div. células Prom.	Frec. 10 ⁻⁵
		Simples chicas m=2	Simples Grandes m=5	Gemelas m=5	Totales m=2		
Testigo Positivo	118	117 (0.99)	331 (2.81)	48 (0.41)	496 (4.20)	3.99	14.9
DMN+ []							
250	118	82 d+ (0.69)	349 - (2.96)	39 - (0.33)	470 - (3.98)	3.97	13.1
500	120	83 d+ (0.69)	356 - (2.97)	33 - (0.28)	472 - (3.93)	4.11	12.3
2500	120	105 - (0.87)	199 d+ (1.66)	13 + (0.11)	317 d+ (2.64)	3.56	9.2
5000	116	70 + (0.60)	282 - (2.43)	32 - (0.28)	384 d+ (3.31)	4.15	11.7

Análisis estadístico con el programa SMART (Würgler, no publicado): +, positivo; d+, débil positivo; -, negativo; P = 0.05.

*, DMSO [2.0 %] + Tween 80 [1.5 %] + DMN [925 ppm].

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

Tabla XVI. Frecuencia de manchas inducidas por DMSO + Tween + MMS y diferentes concentraciones de la resina de *Ipomoea orizabensis* en células del ala de *Drosophila melanogaster*.
Exposición: 48 X 6.

Compuesto	Núm. de alas	Manchas				Div. celulas Prom.	Frec. 10 ⁻⁵
		Simples chicas m=2	Simples Grandes m=5	Gemelas m=5	Totales m=2		
Testigo Positivo*	118	48 (0.41)	49 (0.42)	16 (0.14)	113 (0.96)	3.87	3.8
[]+MMS							
2500	120	27 + (0.22)	48 - (0.40)	7 + (0.06)	82 d+ (0.68)	4.20	2.6
3750	120	14 + (0.12)	55 - (0.46)	8 - (0.07)	77 d+ (0.64)	4.97	2.5
4375	120	17 + (0.14)	43 - (0.36)	8 - (0.07)	68 + (0.57)	5.10	2.3
5000	120	10 + (0.08)	41 - (0.34)	7 + (0.06)	58 + (0.48)	5.31	1.7
6250	120	20 + (0.17)	19 d+ (0.16)	5 + (0.04)	44 + (0.37)	3.49	1.4

Análisis estadístico con el programa SMART (Würgler, no publicado): +, positivo; d+, débil positivo; -, negativo; P = 0.05.

*. DMSO [1.5 %] + Tween 80 [1.0 %] + MMS [1 mM].

Tabla XVII. Frecuencia de manchas inducidas por MMS + DMSO + Tween y diferentes concentraciones de la resina de *Ipomoea orizabensis* en células del ala de *Drosophila melanogaster*.
Exposición: 6 X 48.

Compuesto	Núm. de alas	Manchas				Div. celulas res Prom.	Frec. 10 ⁻⁵
		Simples chicas m=2	Simples Grandes m=5	Gemelas m=5	Totales m=2		
Testigo Positivo*	120	52 (0.43)	64 (0.53)	16 (0.13)	132 (1.10)	3.74	4.1
MMS+[]							
2500	120	25 + (0.21)	41 d+ (0.34)	11 - (0.09)	77 + (0.64)	4.37	2.4
3750	120	25 + (0.21)	50 - (0.42)	5 + (0.04)	80 + (0.67)	4.80	2.6
4375	120	23 + (0.19)	55 - (0.46)	4 + (0.03)	82 + (0.68)	4.69	2.7
5000	116	11 + (0.09)	42 d+ (0.36)	7 - (0.06)	60 + (0.52)	5.02	2.0
6250	120	16 + (0.13)	41 d+ (0.34)	7 - (0.06)	64 + (0.54)	5.16	2.1

Análisis estadístico con el programa SMART (Würgler, no publicado): +, positivo; d+, débil positivo; -, negativo; P = 0.05.

*. MMS [1 mM] + DMSO [1.5 %] + Tween 80 [1.0 %].

Tabla XVIII. Frecuencia de manchas inducidas por DMSO + Tween + MMC y diferentes concentraciones de la resina de *Ipomoea orizabensis* en células del ala de *Drosophila melanogaster*.
Exposición: 48 X 6.

Compuesto	Núm. de alas	Manchas				Div. células Prom.	Frec. 10 ⁻⁵
		Simples chicas m=2	Simples Grandes m=5	Gemelas m=5	Totales m=2		
Testigo Positivo*	80	62 (0.77)	29 (0.36)	3 (0.04)	94 (1.17)	2.83	4.6
[]+MMC							
2500	80	28 + (0.35)	15 d+ (0.19)	2 - (0.02)	45 + (0.56)	2.82	2.2
3750	78	21 + (0.27)	19 - (0.24)	4 - (0.05)	44 + (0.56)	3.68	2.3
4375	80	20 + (0.25)	9 + (0.11)	4 - (0.05)	33 + (0.41)	3.36	1.7
5000	78	17 + (0.22)	15 d+ (0.19)	3 - (0.03)-	35 + (0.45)	3.53	1.8
6250	80	11 + (0.14)	8 + (0.10)	1 - (0.01)	20 + (0.25)	3.55	1.0

Análisis estadístico con el programa SMART (Würgler, no publicado): +, positivo; d+, débil positivo; -, negativo; P = 0.05.

*. DMSO [1.5 %] + Tween 80 [1.0 %] + MMC [0.625 mM].

Tabla XIX. Frecuencia de manchas inducidas por DMSO + Tween + MMC y diferentes concentraciones de la resina de *Ipomoea orizabensis* en células del ala de *Drosophila melanogaster*.
Exposición: 6 X 48.

Compuesto	Núm. de alas	Manchas				Div. células Prom.	Frec. 10 ⁻⁵
		Simples chicas m=2	Simples Grandes m=5	Gemelas m=5	Totales m=2		
Testigo Positivo*	120	110 (0.92)	29 (0.24)	6 (0.05)	145 (1.21)	1.82	4.6
MMC+[]							
2500	120	44 + (0.37)	15 d+ (0.12)	3 - (0.03)	62 + (0.52)	2.62	2.1
3750	120	33 + (0.28)	18 - (0.15)	5 - (0.04)	56 + (0.47)	2.43	1.8
4375	118	30 + (0.25)	13 d+ (0.11)	3 - (0.03)	46 + (0.39)	2.65	1.6
5000	120	26 + (0.22)	12 d+ (0.10)	2 - (0.02)	40 + (0.33)	3.03	1.4
6250	120	13 + (0.11)	10 + (0.08)	4 - (0.03)	27 + (0.22)	3.30	0.9

Análisis estadístico con el programa SMART (Würgler, no publicado): +, positivo; d+, débil positivo; -, negativo; P = 0.05.

*. MMC [0.625 mM] + DMSO [1.5 %] + Tween 80 [1.0 %].

Tabla XX. Frecuencia de manchas inducidas con diferentes concentraciones de la Vitamina C en células del ala de *Drosophila melanogaster*.
Exposición: 48 X 6.

Compuesto	Núm. de alas	Manchas				Div. células Prom.	Frec. 10^{-5}
		Simples chicas m=2	Simples Grandes m=5	Gemelas m=5	Totales m=2		
Testigo Negativo*	120	27 (0.22)	3 (0.03)	1 (0.01)	31 (0.26)	1.50	1.0
[I+Sac**							
100	120	27 (0.22)	2 (0.02)	0 (0.00)	24 (0.29)	1.79	1.0
1000	120	28 (0.23)	9 (0.08)	0 (0.00)	31 (0.37)	2.19	1.3
2500	120	24 (0.20)	0 (0.00)	5 (0.04)	29 (0.24)	1.55	1.0

Análisis estadístico con el programa SMART (Würgler, no publicado), $P = 0.05$.

*. Agua destilada.

**., Tratamiento crónico: Vitamina C y tratamiento agudo con sacarosa al 5%.

Tabla XXI. Frecuencia de manchas inducidas con diferentes concentraciones de la Vitamina C en células del ala de *Drosophila melanogaster*.
Exposición: 6 X 48.

Compuesto	Núm. de alas	Manchas				Div. células Prom.	Frec. 10 ⁻³
		Simples chicas m=2	Simples Grandes m=5	Gemelas m=5	Totales m=2		
Testigo Negativo	120	27 (0.22)	4 (0.03)	1 (0.01)	27 (0.32)	1.58	1.1
Sac+[]''							
100	120	26 (0.22)	8 (0.07)	2 (0.02)	36 (0.30)	2.31	1.2
1000	118	17 (0.14)	4 (0.03)	3 (0.03)	24 (0.20)	2.21	0.8
2500	118	21 (0.18)	4 (0.03)	5 (0.04)	30 (0.25)	2.10	1.0

Análisis estadístico con el programa SMART (Würgler, no publicado), P = 0.05.

', Agua destilada.

'', Tratamiento agudo con sacarosa al 5% y tratamiento crónico: Vitamina C.

Tabla XXII. Frecuencia de manchas inducidas por agua destilada + DMN y diferentes concentraciones de la Vitamina C en células del ala de *Drosophila melanogaster*.
Exposición: 48 X 6.

Compuesto	Núm. de alas	Manchas				Div. células Prom.	Frec. 10 ⁻⁵
		Simples chicas m=2	Simples Grandes m=5	Gemelas m=5	Totales m=2		
Testigo Positivo*	120	99 (0.82)	256 (2.13)	28 (0.23)	383 (3.19)	3.85	11.1
[]+DMN							
100	120	66 d+ (0.55)	244 - (2.03)	19 - (0.16)	329 - (2.74)	4.41	9.5
1000	120	65 d+ (0.54)	217 - (1.81)	30 - (0.25)	312 - (2.60)	4.29	9.2
2500	120	77 d+ (0.64)	243 - (2.03)	30 - (0.25)	350 - (2.94)	4.17	9.3

Análisis estadístico con el programa SMART (Würgler, no publicado): d+, débil positivo; -, negativo; P = 0.05.

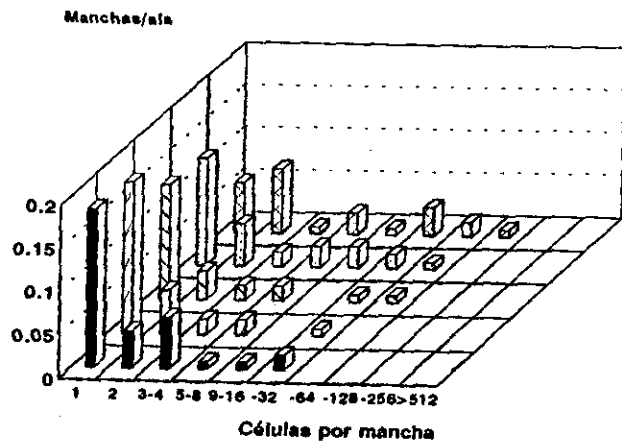
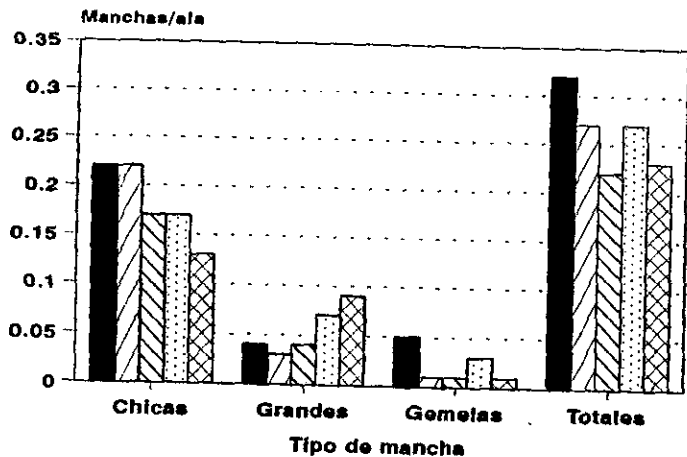
* , Agua destilada + DMN [925 ppm].

Tabla XXIII. Frecuencia de manchas inducidas por DMN + agua destilada y diferentes concentraciones de la Vitamina C en células del ala de *Drosophila melanogaster*.
Exposición: 6 X 48.

Compuesto	Núm. de alas	Manchas				Div. células Prom.	Frec. 10 ⁻³
		Simples chicas m=2	Simples Grandes m=5	Gemelas m=5	Totales m=2		
Testigo Positivo*	120	112 (0.93)	337 (2.81)	39 (0.32)	488 (4.07)	3.97	13.8
DMN+ []							
100	120	79 d+ (0.66)	319 - (2.66)	30 - (0.25)	428 - (3.57)	4.31	12.3
1000	120	65 + (0.54)	269 - (2.24)	30 - (0.25)	364 d+ (3.03)	4.46	9.6
2500	120	39 + (0.33)	295 - (2.50)	22 d+ (0.19)	356 d+ (3.02)	4.75	8.9

Análisis estadístico con el programa SMART (Würgler, no publicado): +, positivo; d+, débil positivo; -, negativo; P = 0.05.

* , DMN [925 ppm] + Agua destilada.



c)

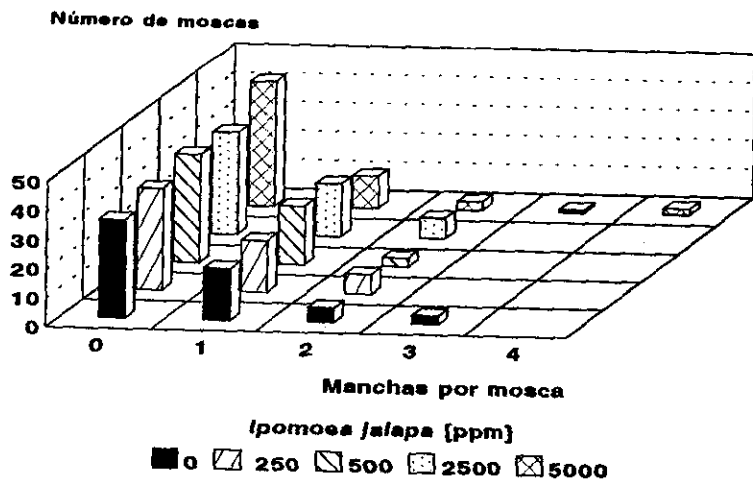


Fig. 19 a) Frecuencia de manchas por ala, b) Frecuencia de células por mancha y c) Manchas por mosca, inducidas por *I. jalapa* (48 X 6).

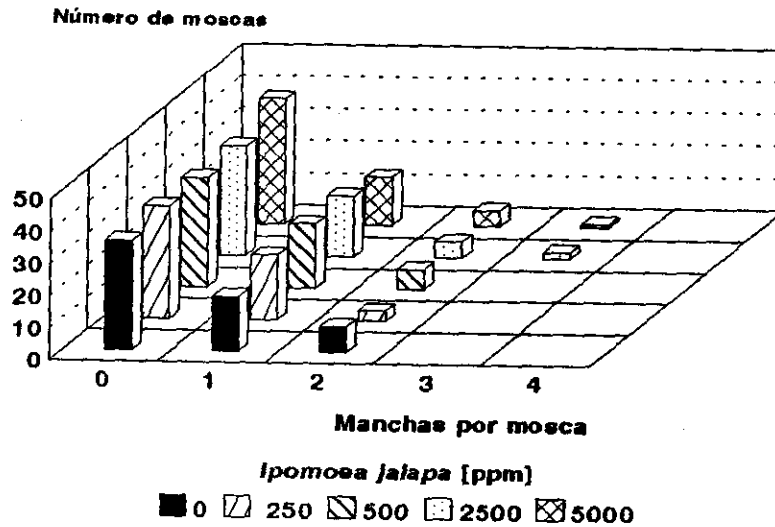
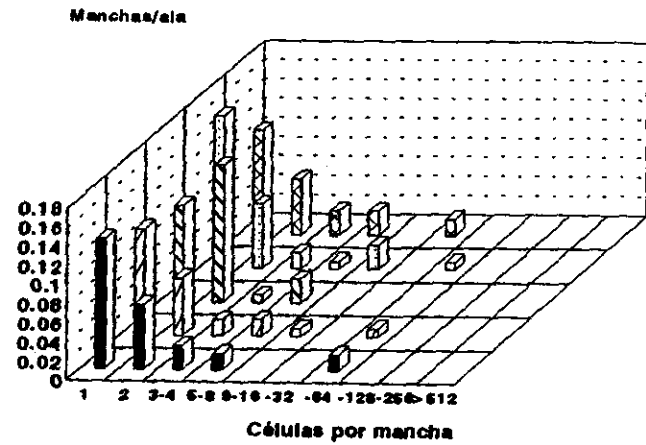
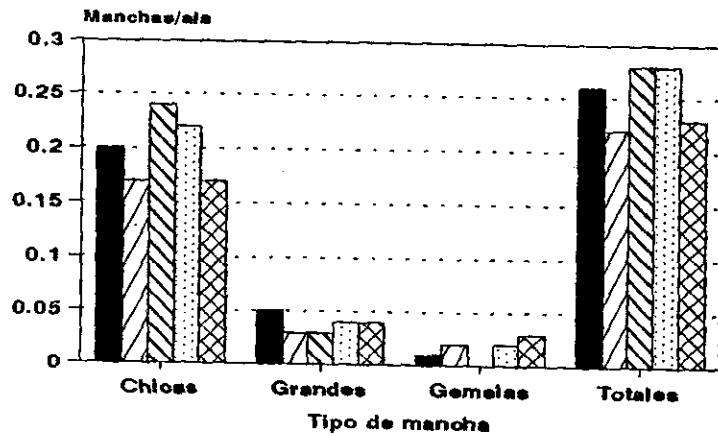
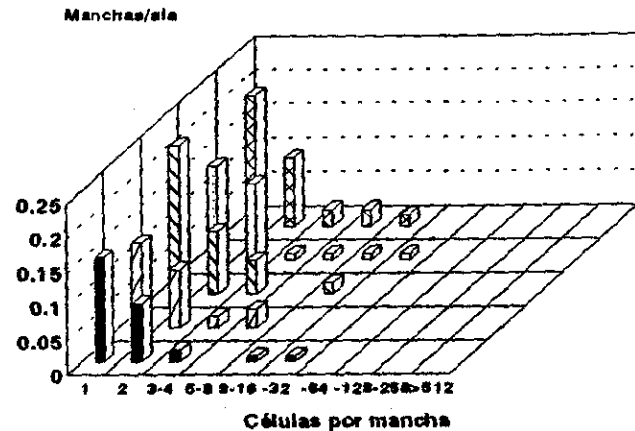
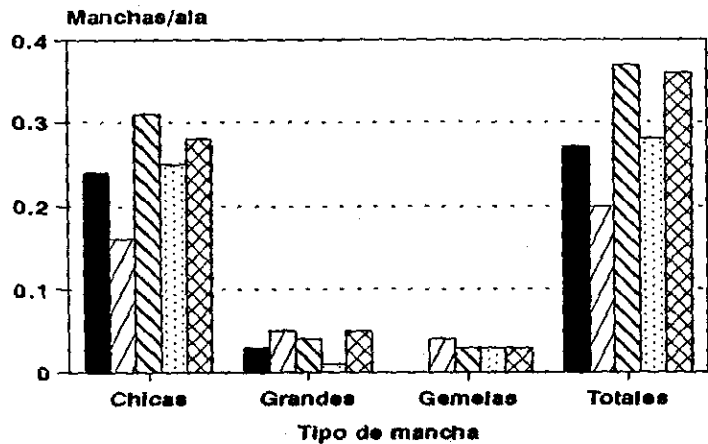


Fig. 20 a) Frecuencia de manchas por ala, b) Frecuencia de células por mancha y c) Manchas por mosca, inducidas por *I. jalapa* (6 X 48).



c)

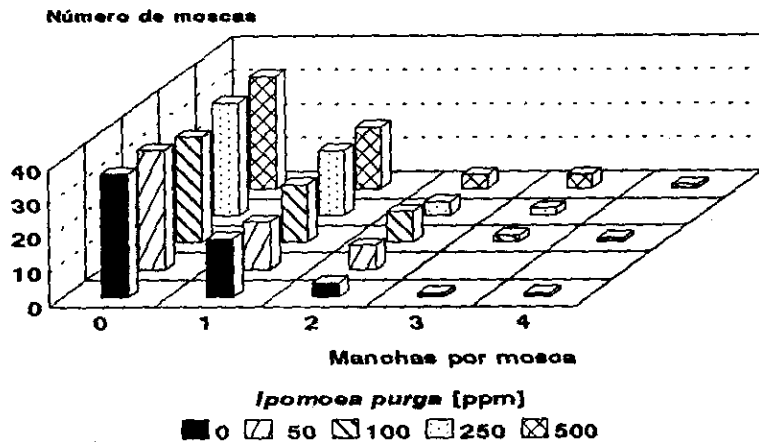


Fig. 21 a) Frecuencia de manchas por ala, b) frecuencia de células por mancha y c) Manchas por moscas, inducidas por *I. purga* (48 X 6).

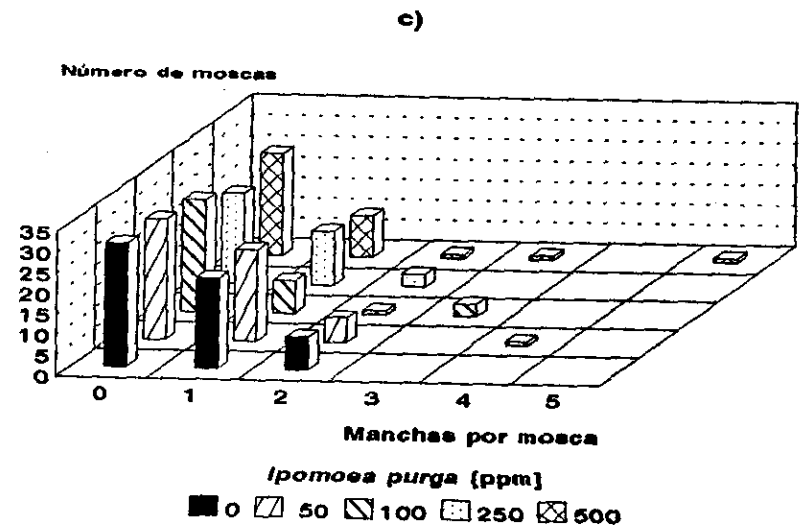
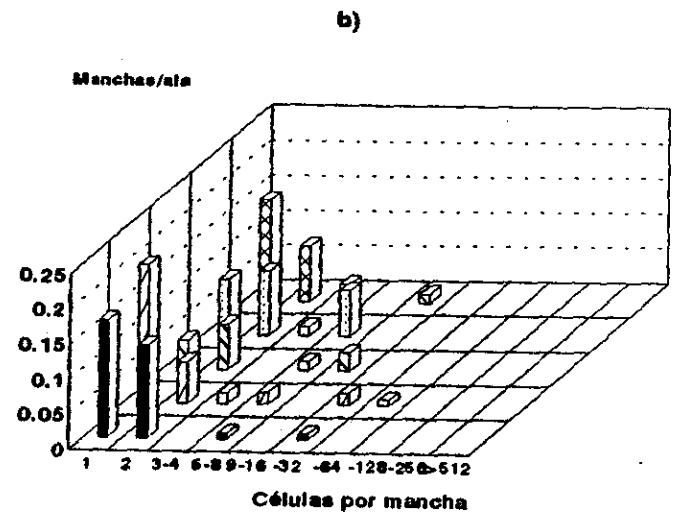
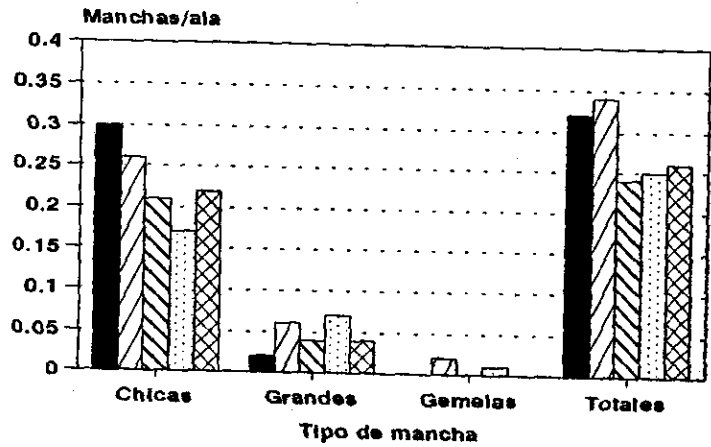
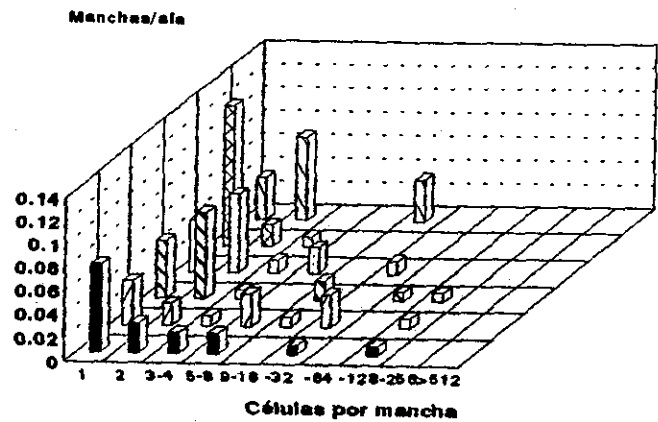
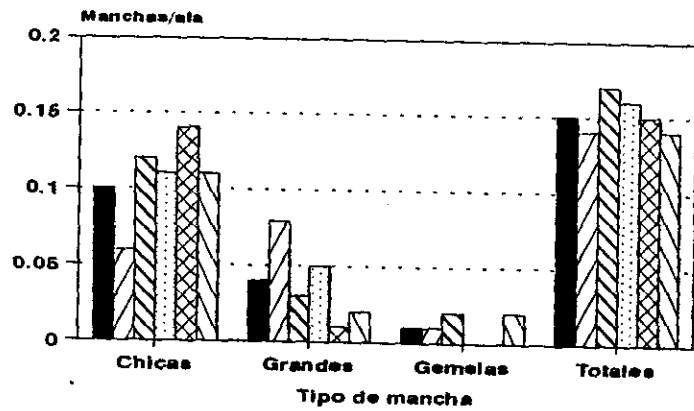


Fig. 22 a) Frecuencia de manchas por ala, b) Frecuencia de células por mancha y c) Manchas por moscas, inducidas por *I. purga* (6 X 48).



c)

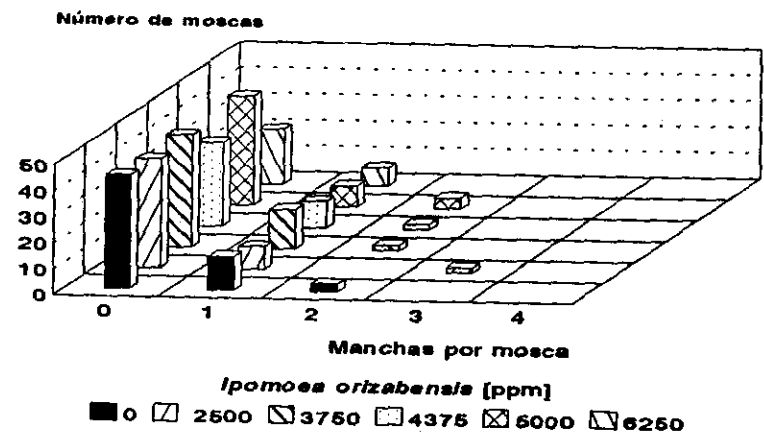


Fig. 23 a) Frecuencia de manchas por ala, b) Frecuencia de células por mancha y c) Manchas por mosca, inducidas por *I. orizabensis* (48 X 6).

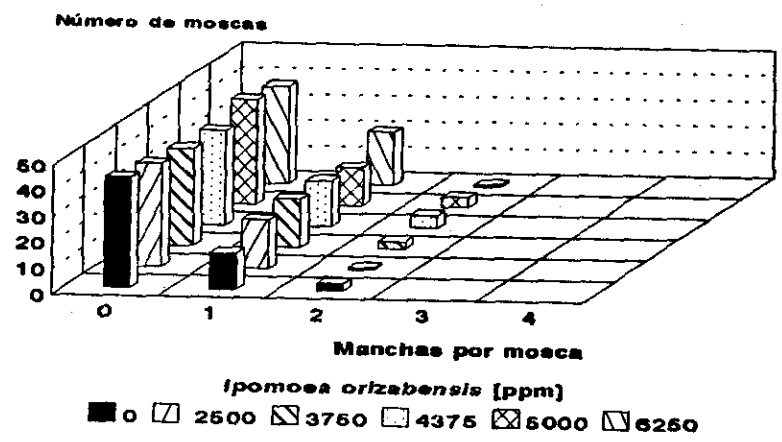
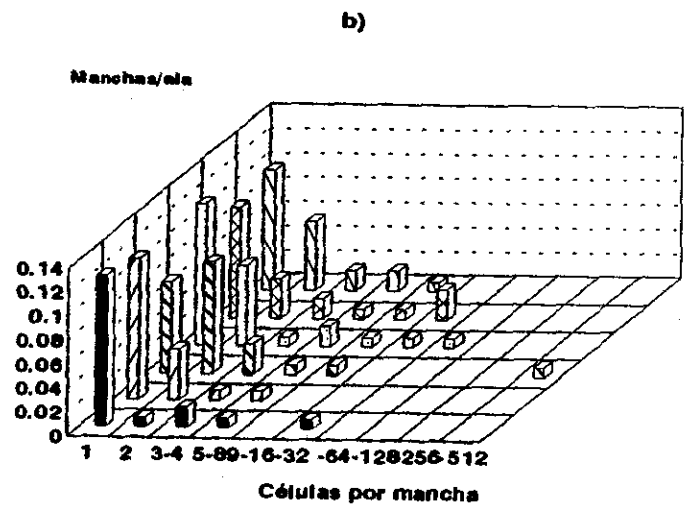
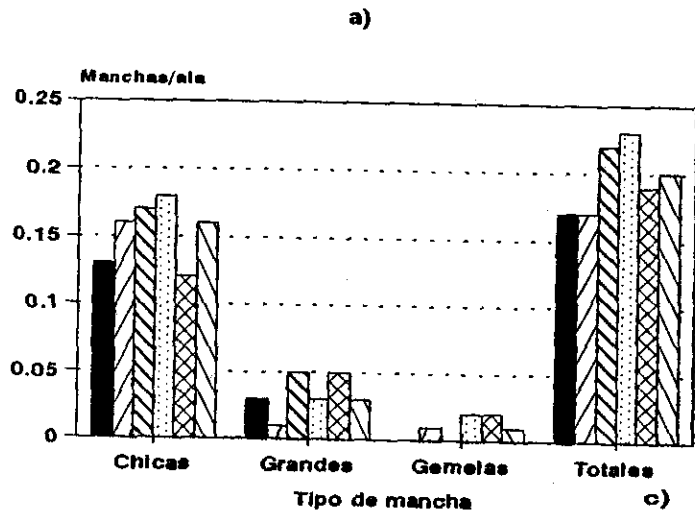
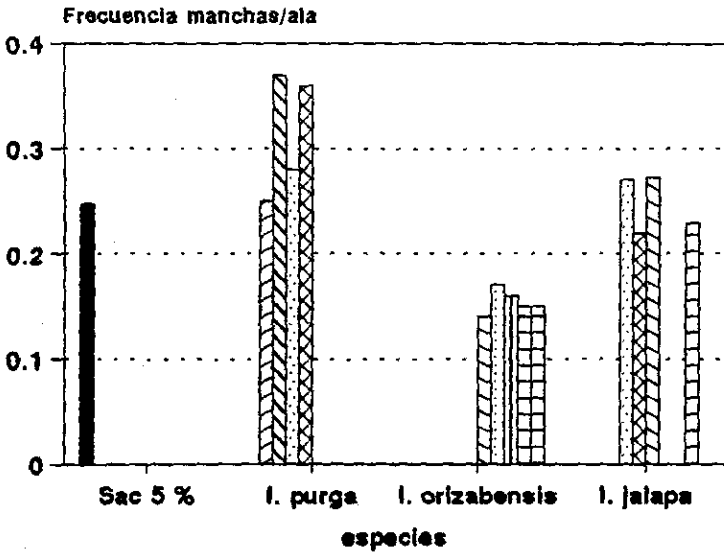
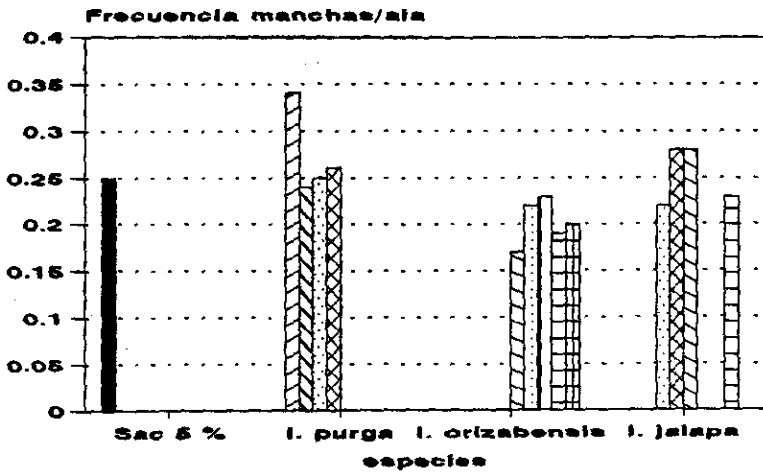


Fig. 24 a)Frecuencia de manchas por ala, b)Frecuencia de células por mancha y c)Manchas por mosca, inducidas por *I. orizabensis* (6 X 48).

a)



b)



Concentración de la resinas de *Ipomoea* [ppm]

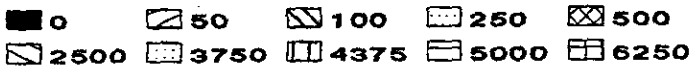


Fig. 25 Frecuencia de manchas totales, inducidas por *I. purga*, *I. orizabensis* e *I. jalapa*: a) 48 X 6 y b) 6 X 48.

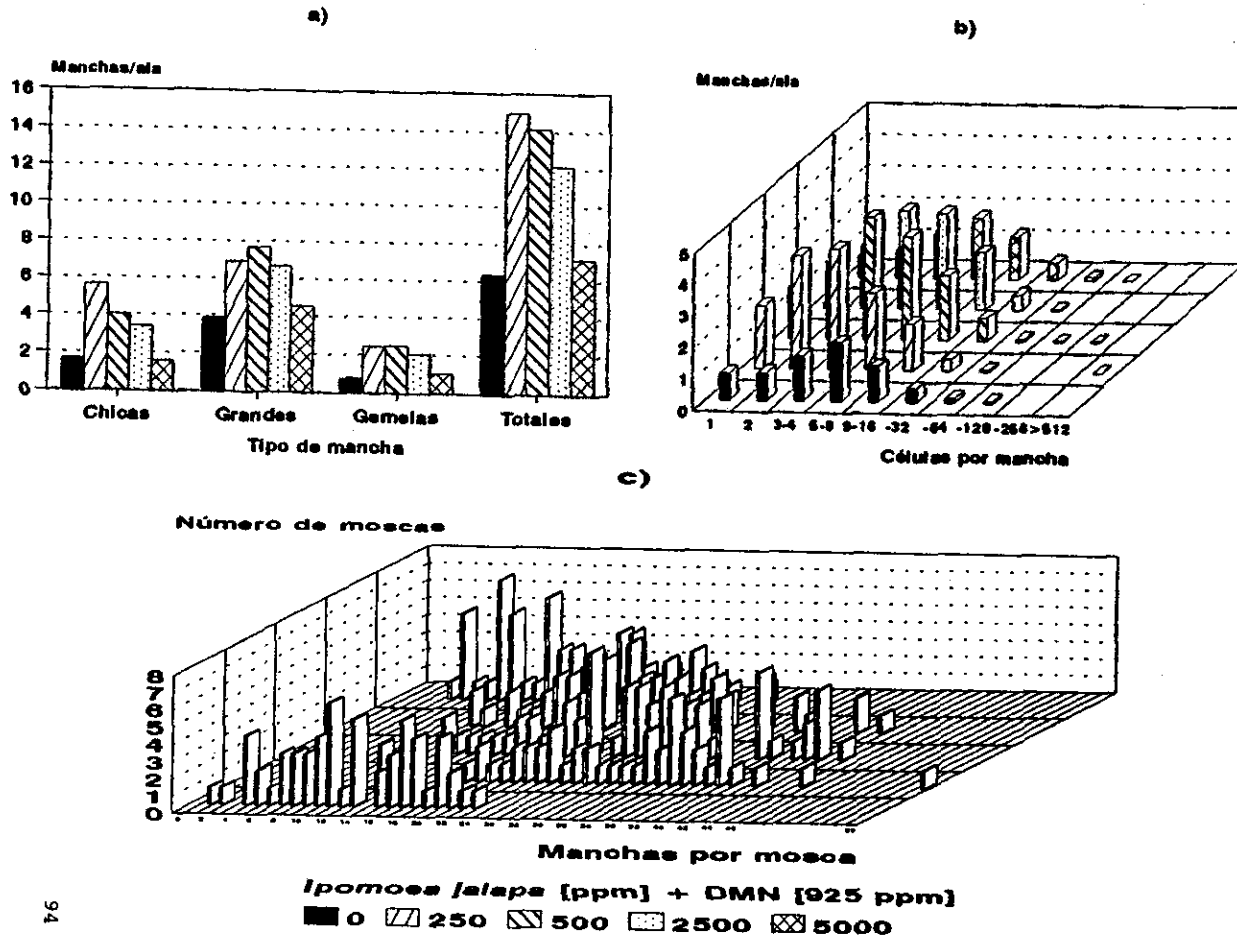


Fig. 26 a)Frecuencia de manchas por ala, b)Frecuencia de células por mancha y c)Manchas por mosca, inducidas por *I. jalapa* + DMN (48 X 6).

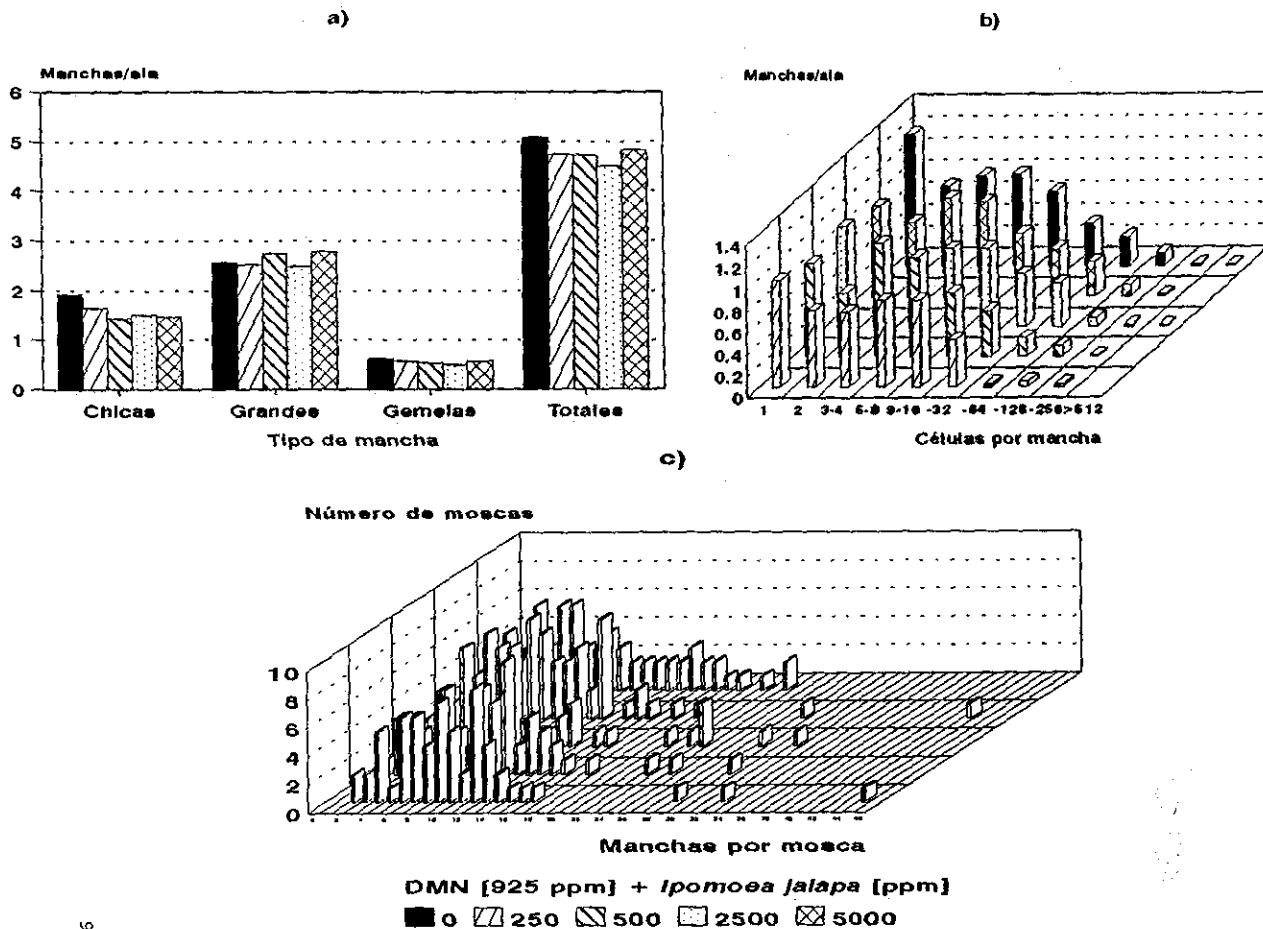


Fig. 27 a) Frecuencia de manchas por ala, b) Frecuencia de células por mancha y c) Manchas por mosca, inducidas por DMN + *I. jalapa* (6 X 48).

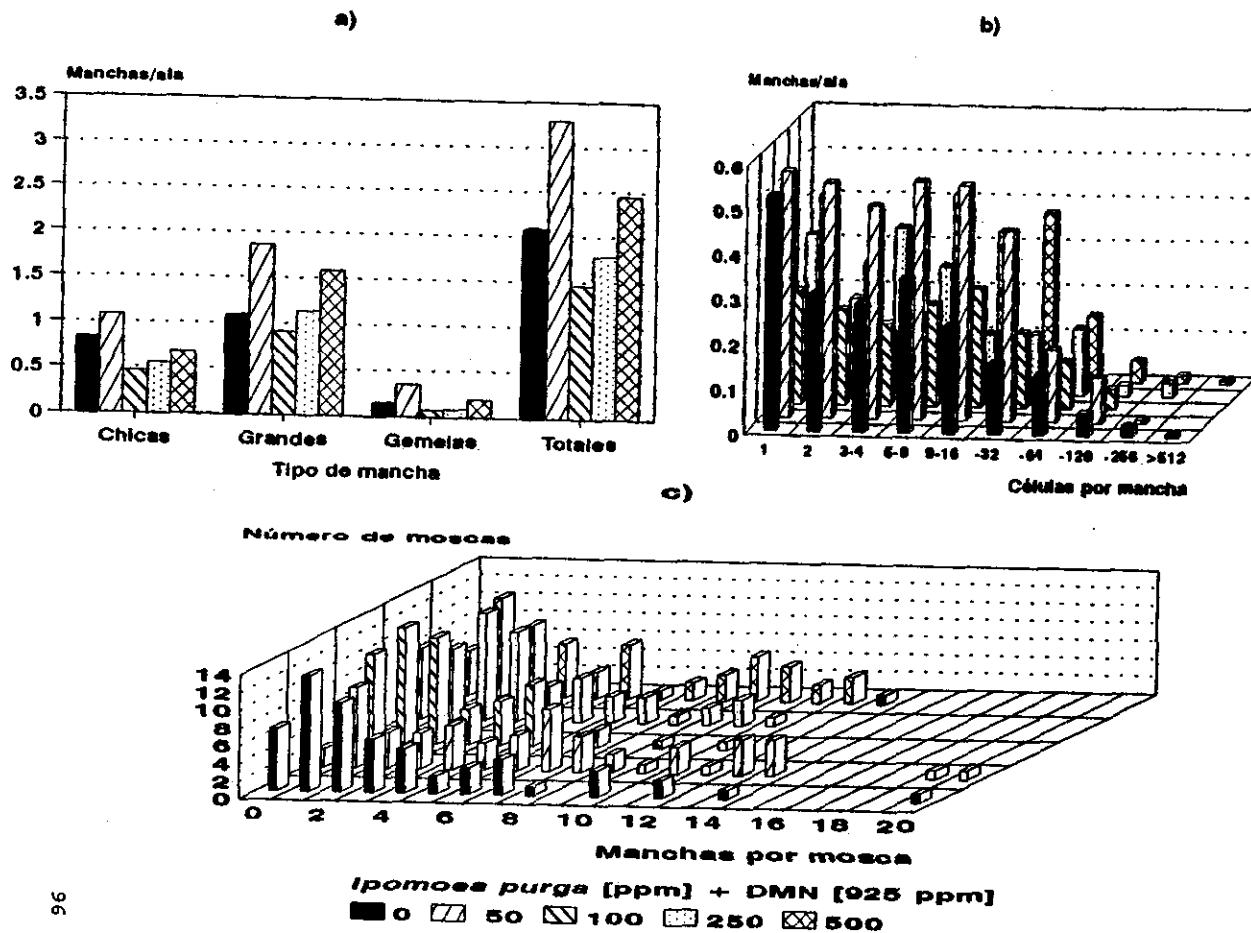


Fig. 28 a) Frecuencia de manchas por ala, b) Frecuencia de células por mancha y c) Manchas por mosca, inducidas por *I. purga* + DMN (48 X 6).

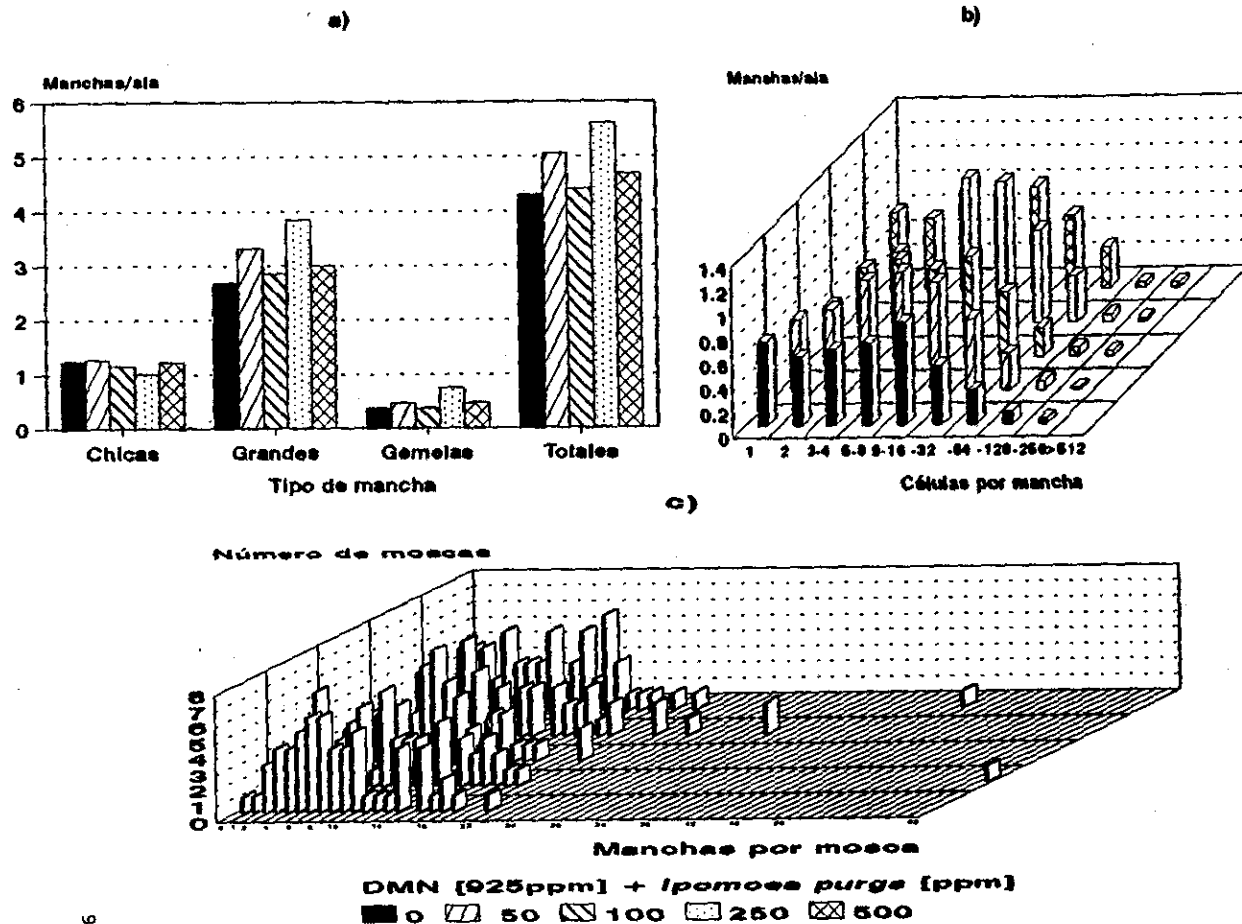


Fig. 29 a) Frecuencia de manchas por ala, b) Frecuencia de células por mancha y c) Manchas por mosca, inducidas por DMN + *I. purga* (6 X 48).

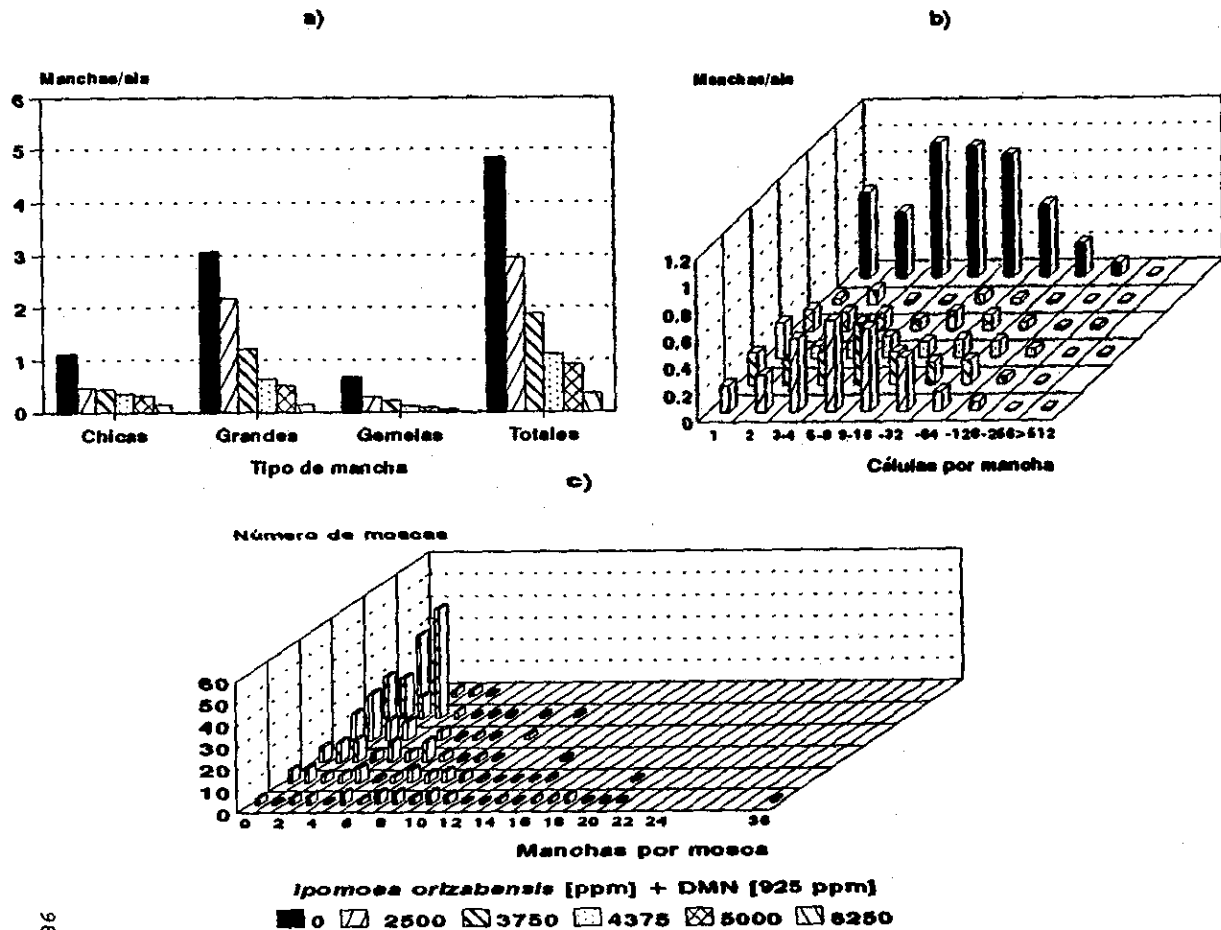


Fig. 30 a)Frecuencia de manchas por ala, b)Frecuencia de células por mancha y c)Manchas por mosca, inducidas por *I. orizabensis* + DMN (48 X 6).

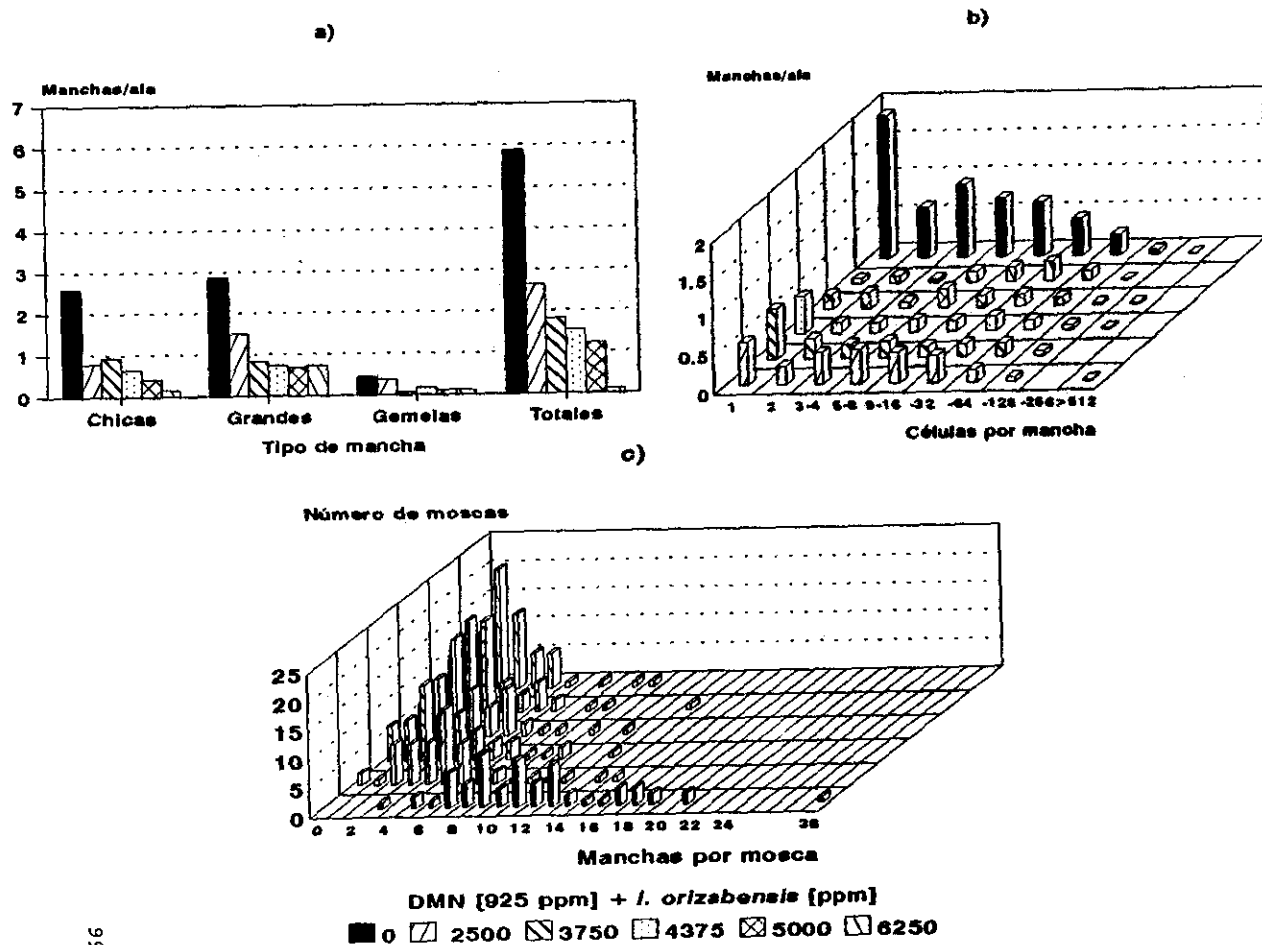
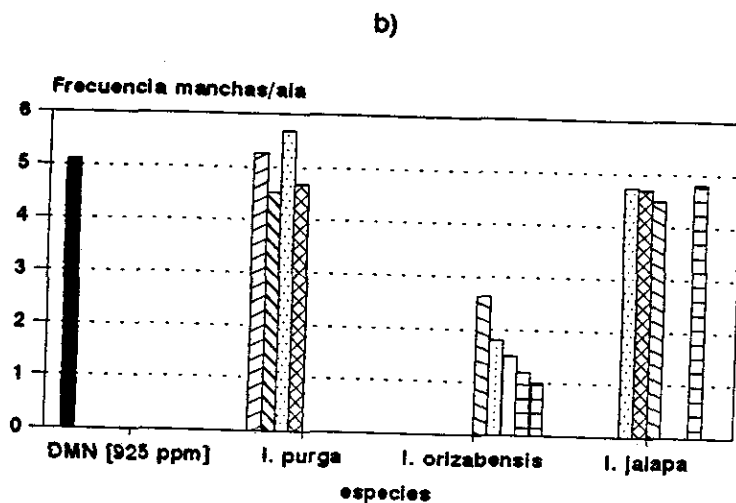
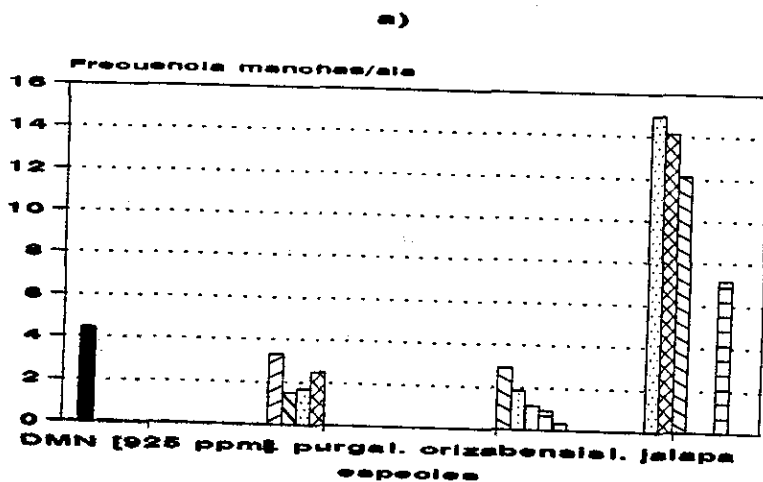


Fig. 31 a) Frecuencia de manchas por ala, b) Frecuencia de células por mancha y c) Manchas por mosca, inducidas por DMN + *I. orizabensis* (6 X 48).



Concentración de la resinas de *Ipomoea* [ppm]

■ 0 ▨ 50 ▩ 100 ▧ 250 ▦ 500

▤ 2500 ▥ 3750 ▦ 4375 ▧ 5000 ▨ 6250

Fig. 32 Frecuencia de manchas totales, inducidas por *I. purga*,¹⁰⁰
I. orizabensis e *I. jalapa* + DMN: a) 48 x 6 y b) 6 x 48.

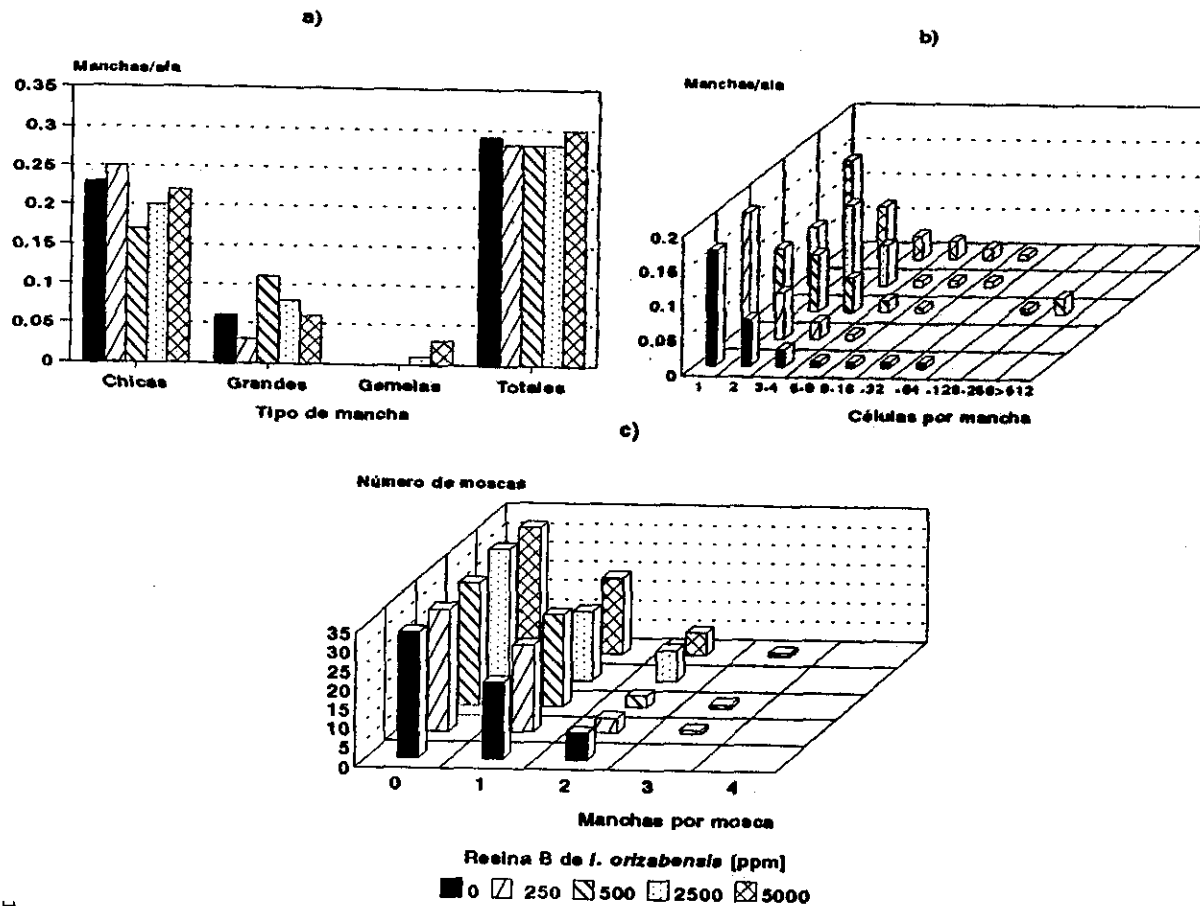


Fig. 33 a)Frecuencia de manchas por ala, b)Frecuencia de células por mancha y c)manchas inducidas por la resina B de *Ipomoea orizabensis* (48 X 6).

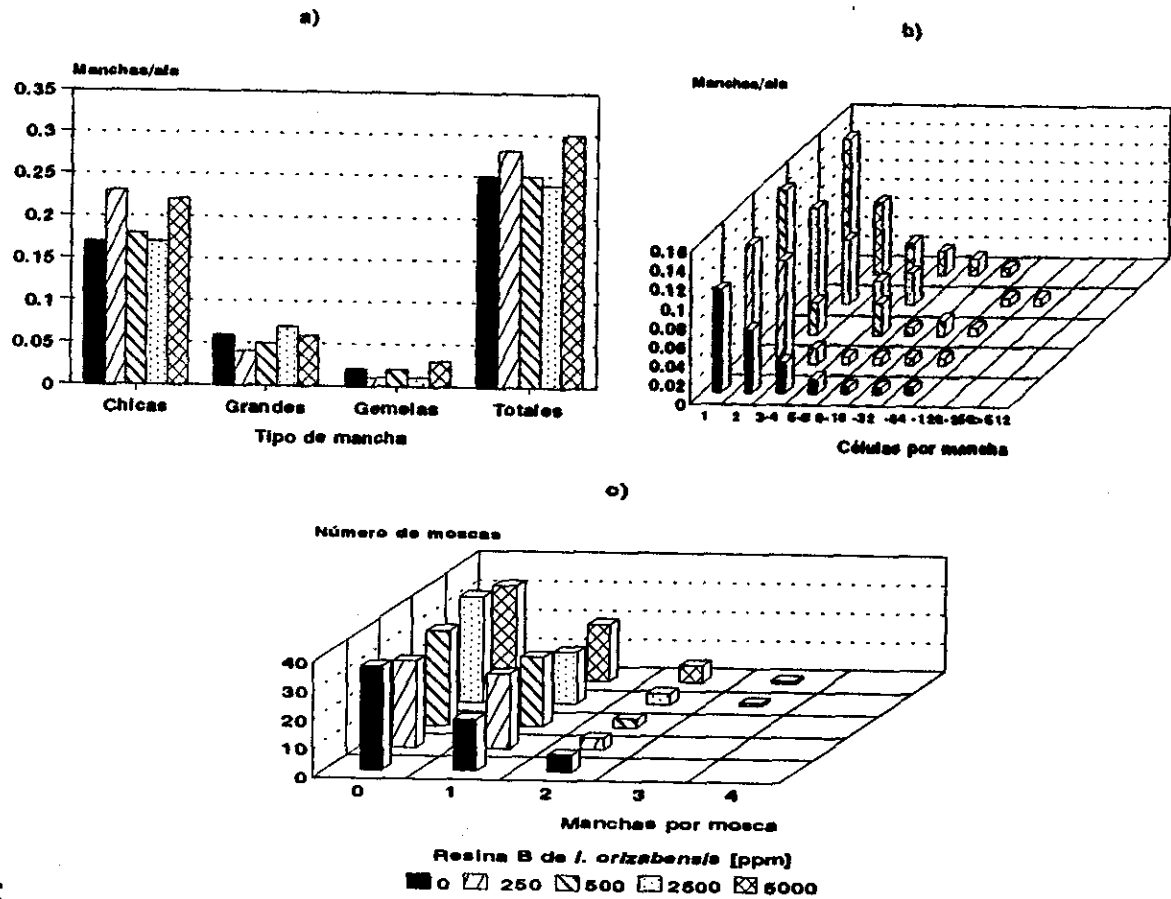
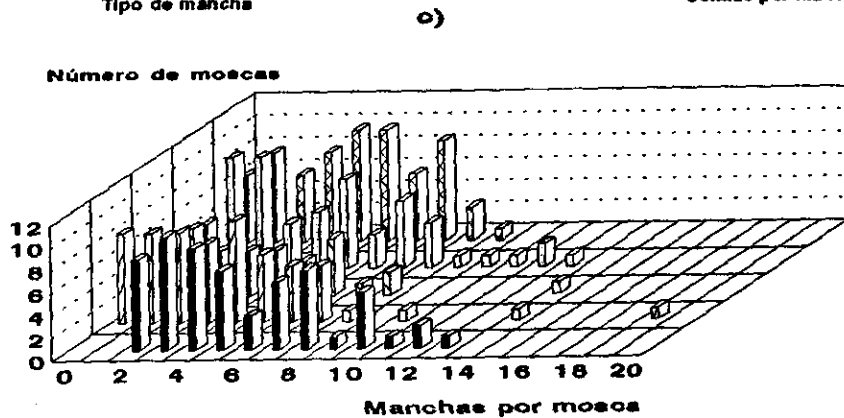
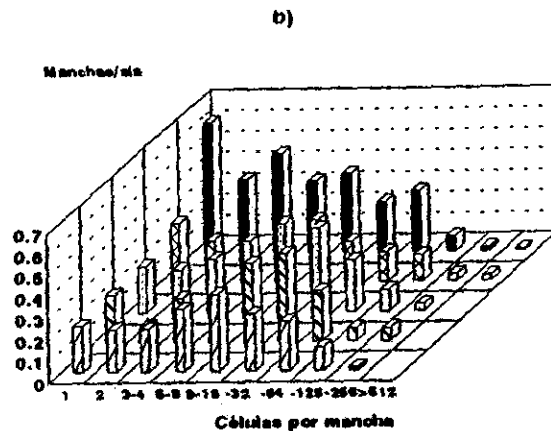
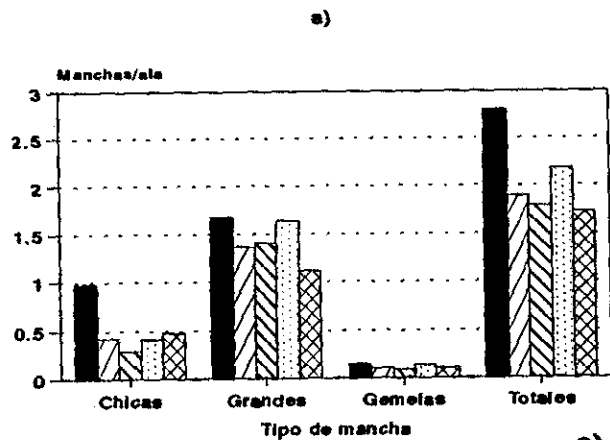


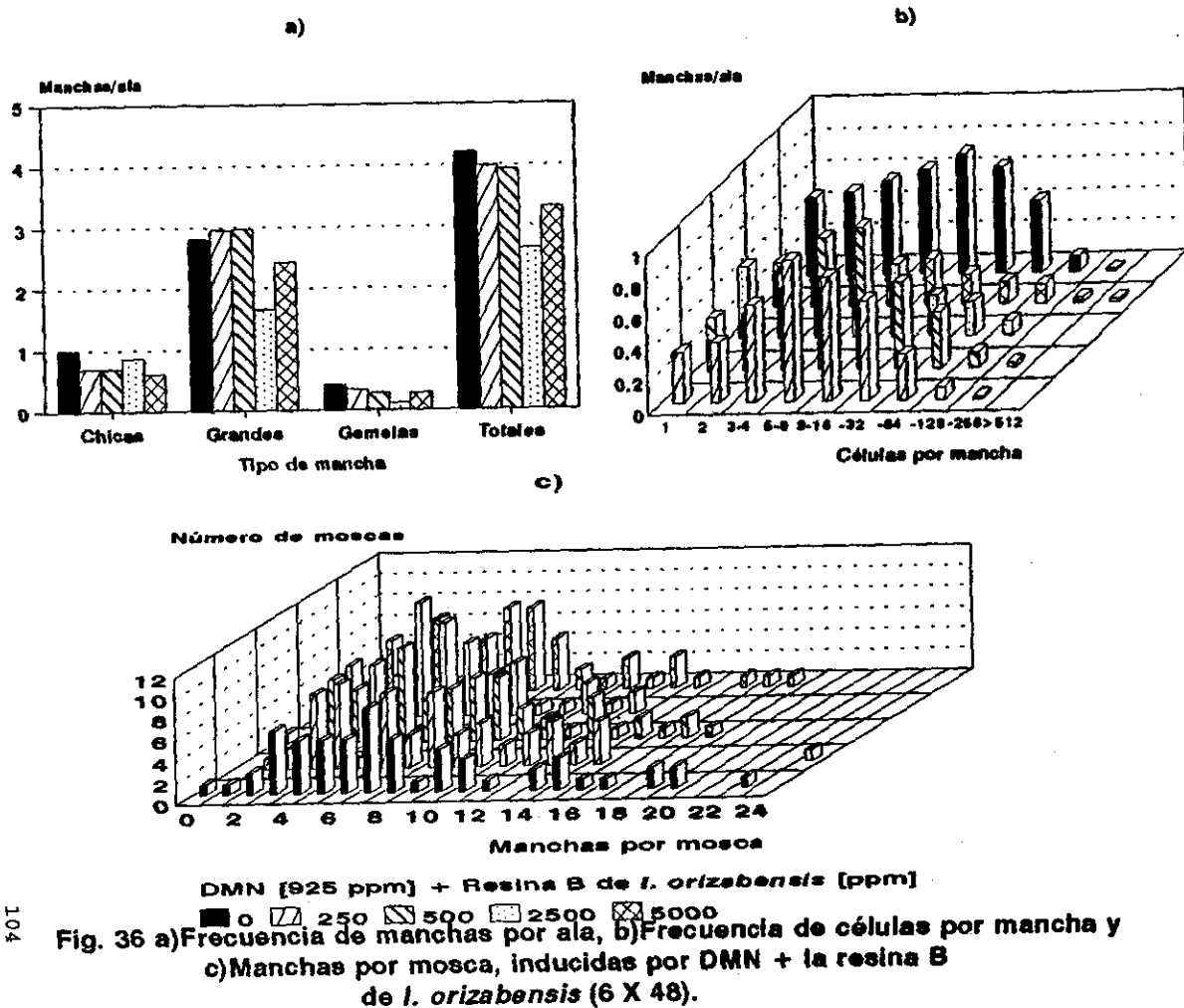
Fig. 34 a) Frecuencia de manchas por ala, b) Frecuencia de células por mancha y c) Manchas por mosca, inducidas por la resina B de *Ipomoea orizabensis* (6 X 48).



Resina B de *I. orizabensis* [ppm] + DMN [925 ppm]

■ 0 ▨ 250 ▩ 500 ▧ 2500 ▦ 5000

Fig. 35 a) Frecuencia de manchas por ala, b) Frecuencia de células por mancha y c) Manchas por mosca, inducidas por la resina B de *I. orizabensis* + DMN (48 X 6).



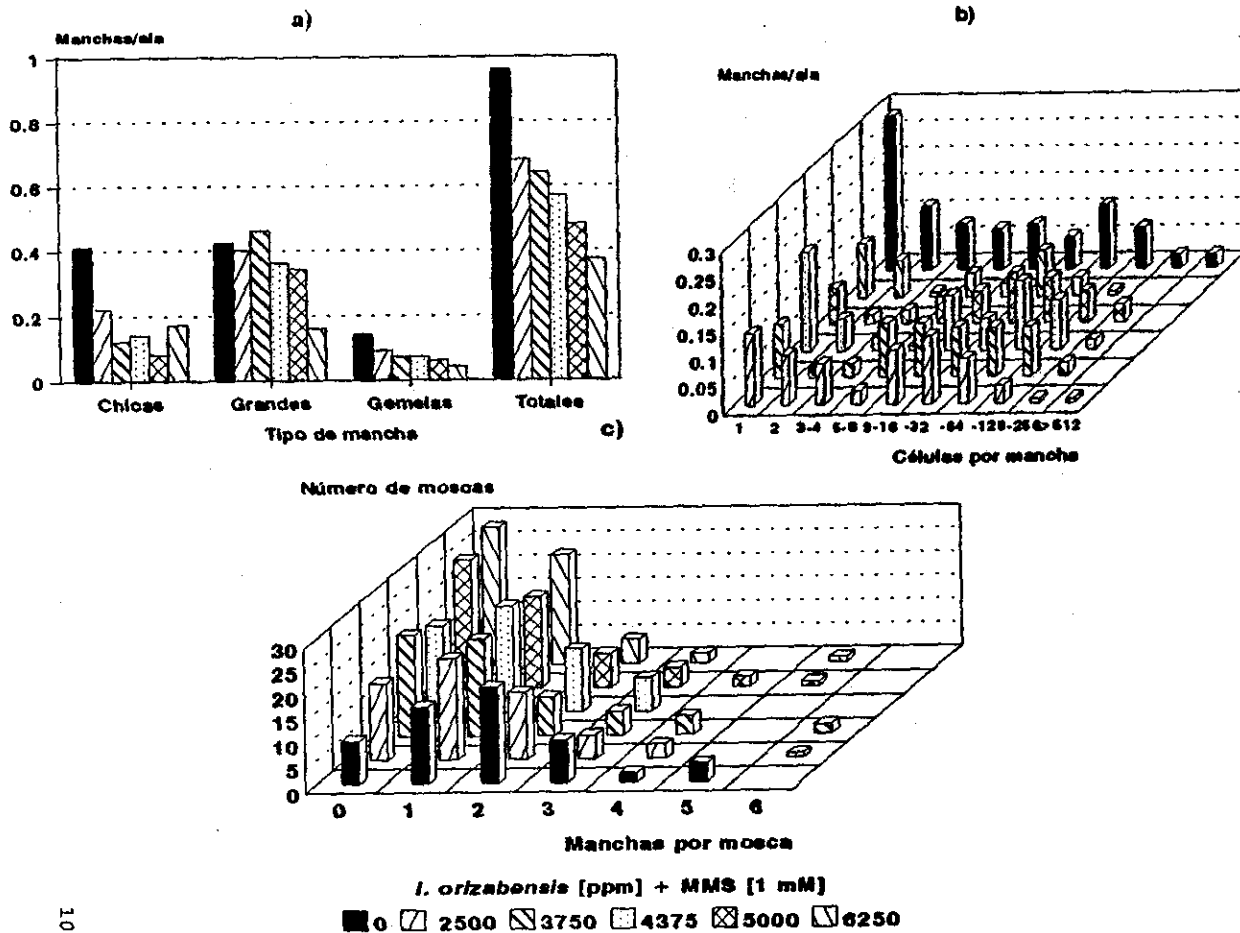


Fig. 37 a) Frecuencia de manchas ala, b) Frecuencia de células por mancha y c) Manchas por mosca, inducidas por *I. orizabensis* + MMS (48 X 6).

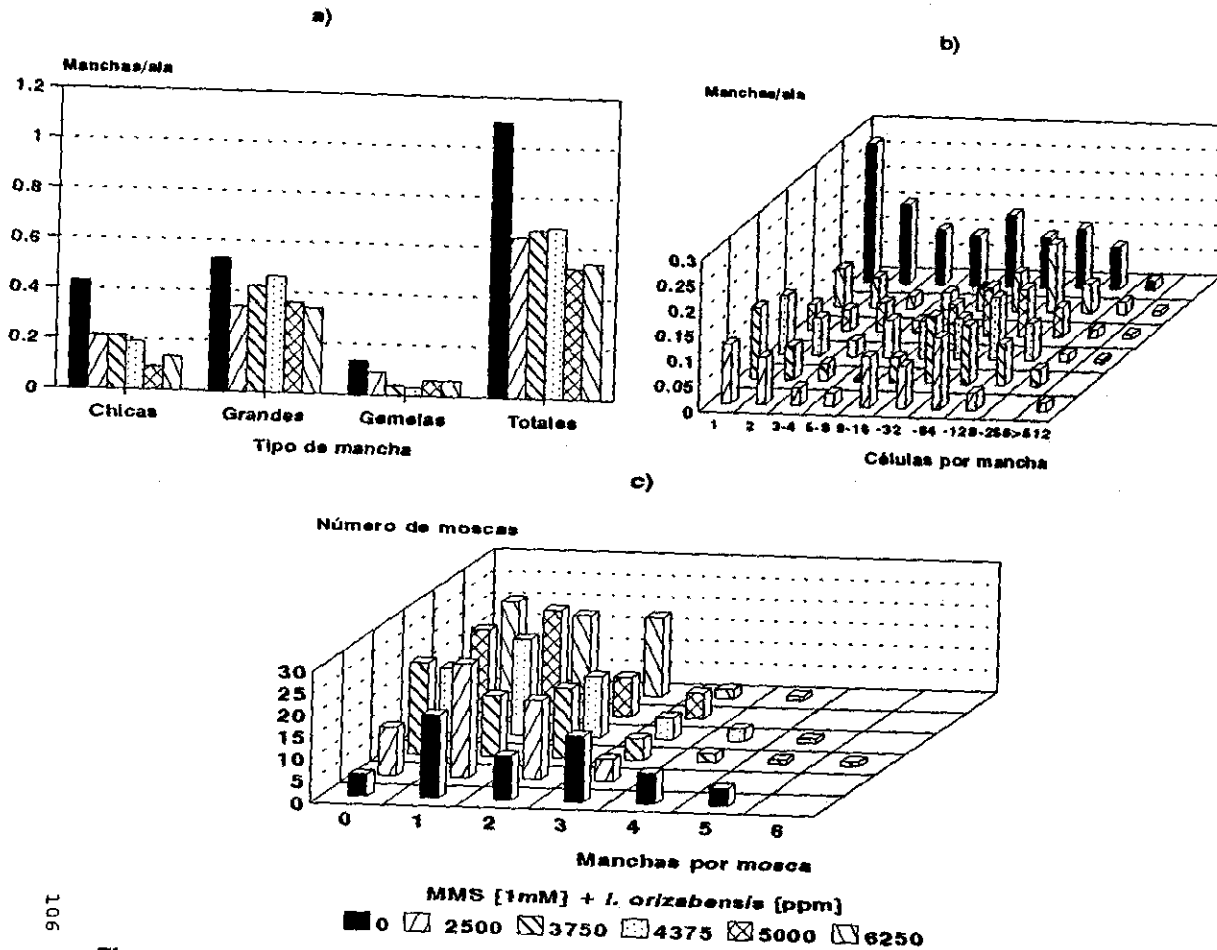


Fig. 38 a) Frecuencia de manchas por ala, b) Frecuencia de células por mancha y c) Manchas por mosca, inducidas por MMS + *I. orizabensis* (6 X 48).

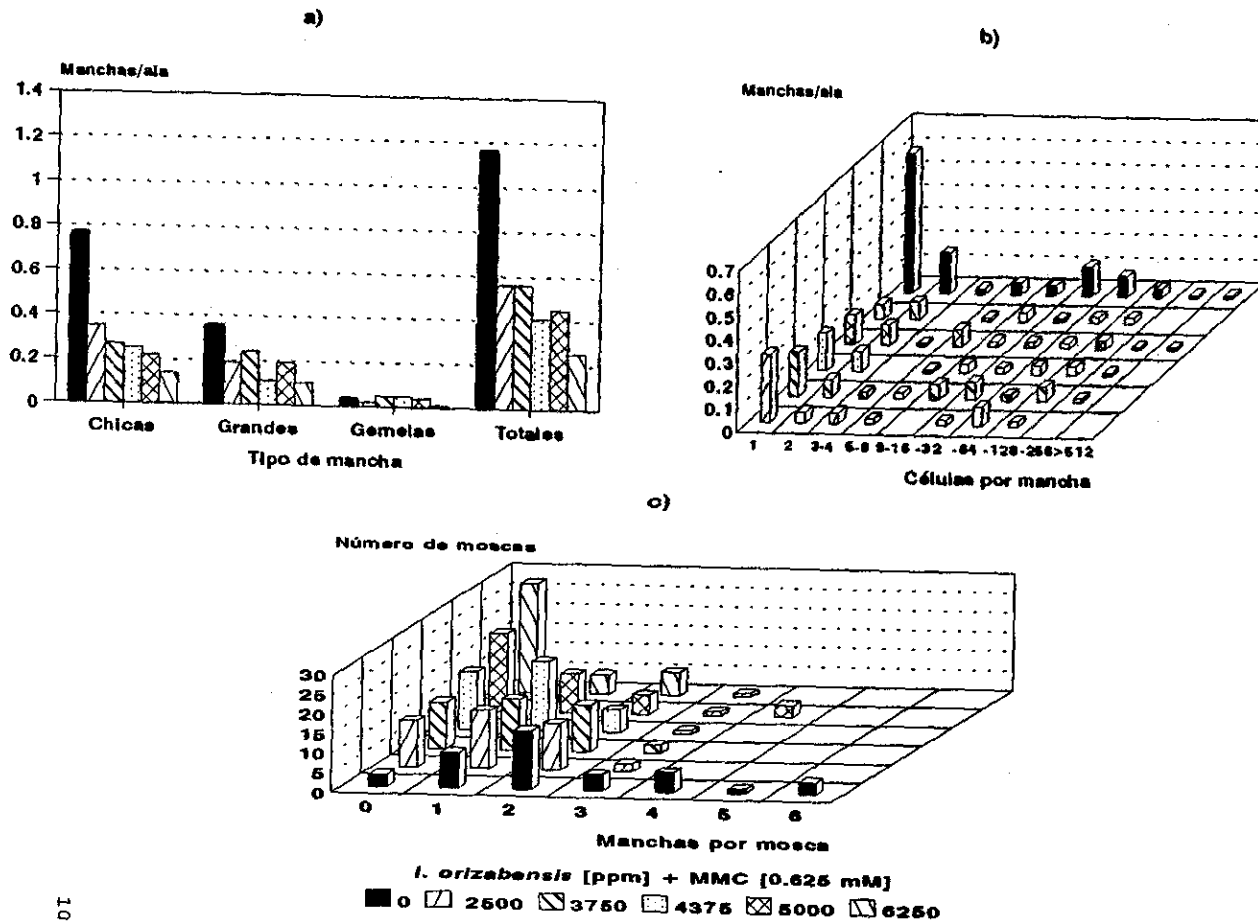


Fig. 39 a) Frecuencia de manchas por ala, b) Frecuencia de células por mancha y c) Manchas por mosca, inducidas por *I. orizabensis* + MMC (48 X 6).

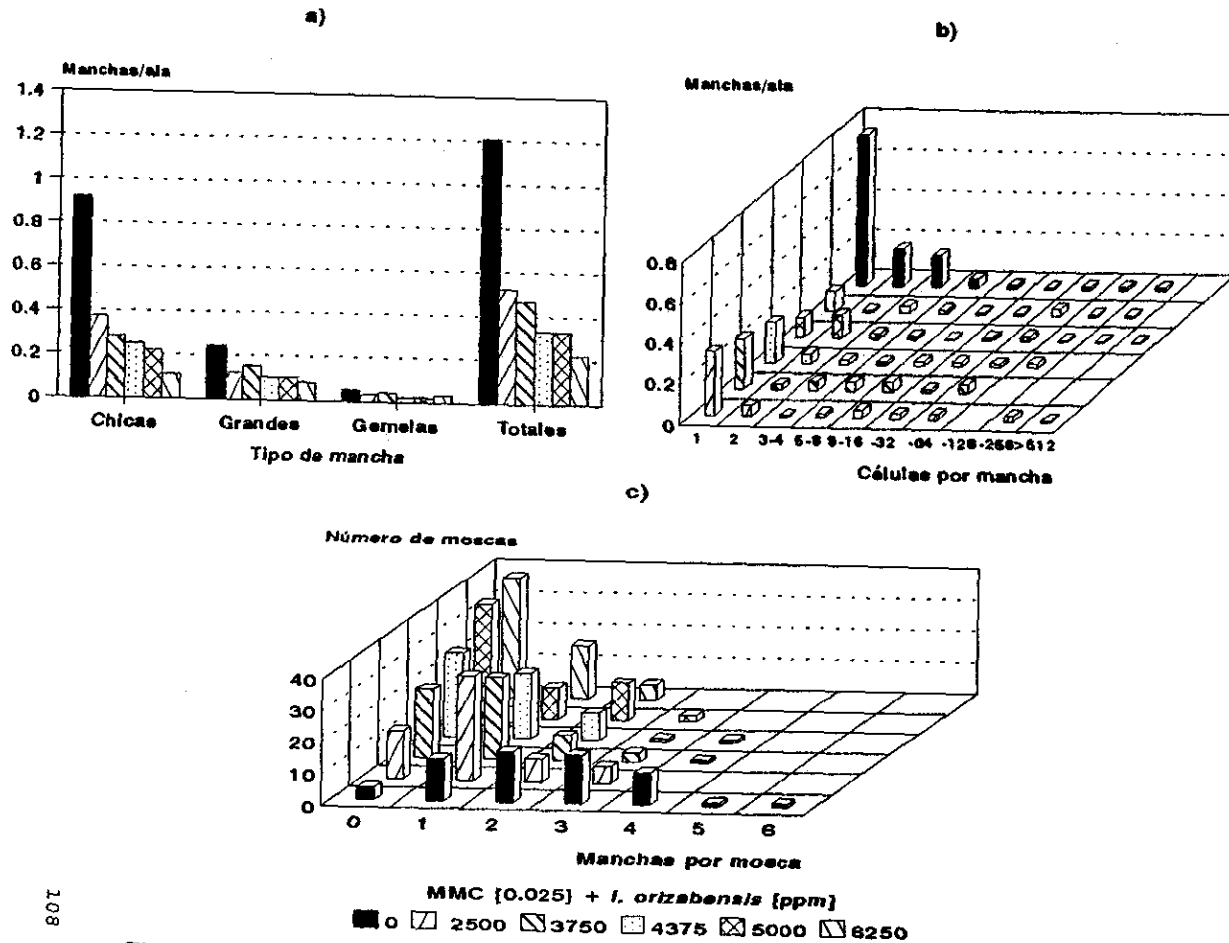
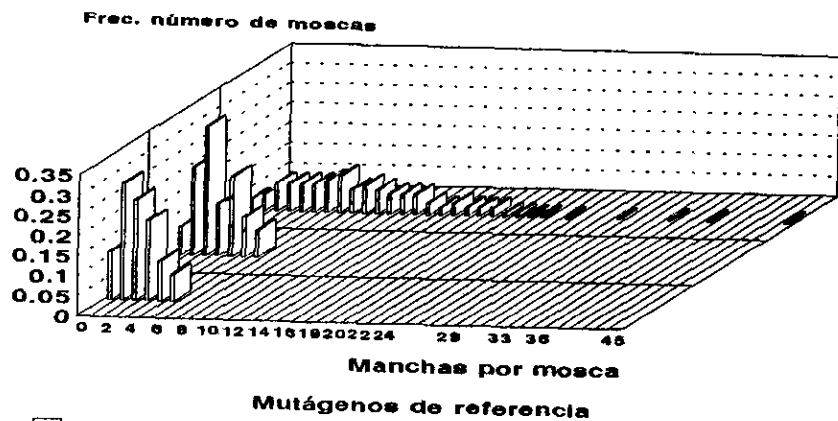
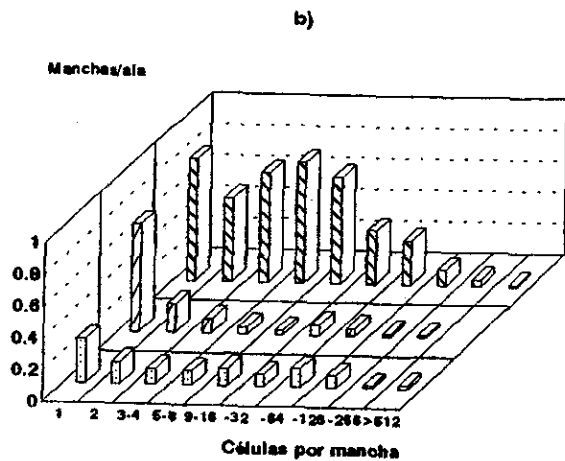
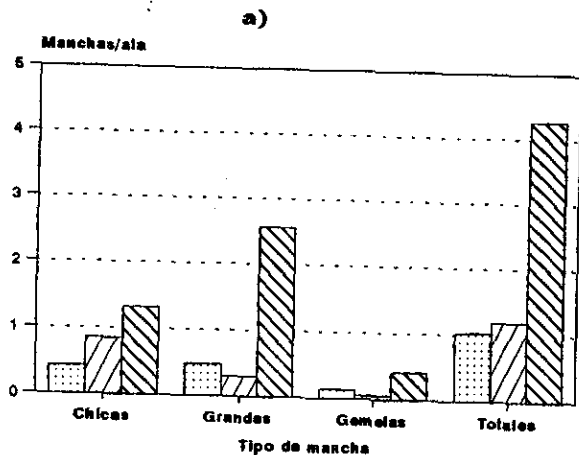


Fig. 40 a)Frecuencia de manchas por ala, b)Frecuencia de células por mancha y c)Manchas por mosca, inducidas por MMC + *I. orizabensis* (6 X 48).



Mutágenos de referencia
 □ MMS [1.0 mM] ▨ MMC [0.625 mM] ▩ DMN [12 mM]

Fig. 41 Mutágenos de referencia: a) Frecuencia de manchas ala, b) Frecuencia de células por mancha y c) Frecuencia de manchas por mosca.

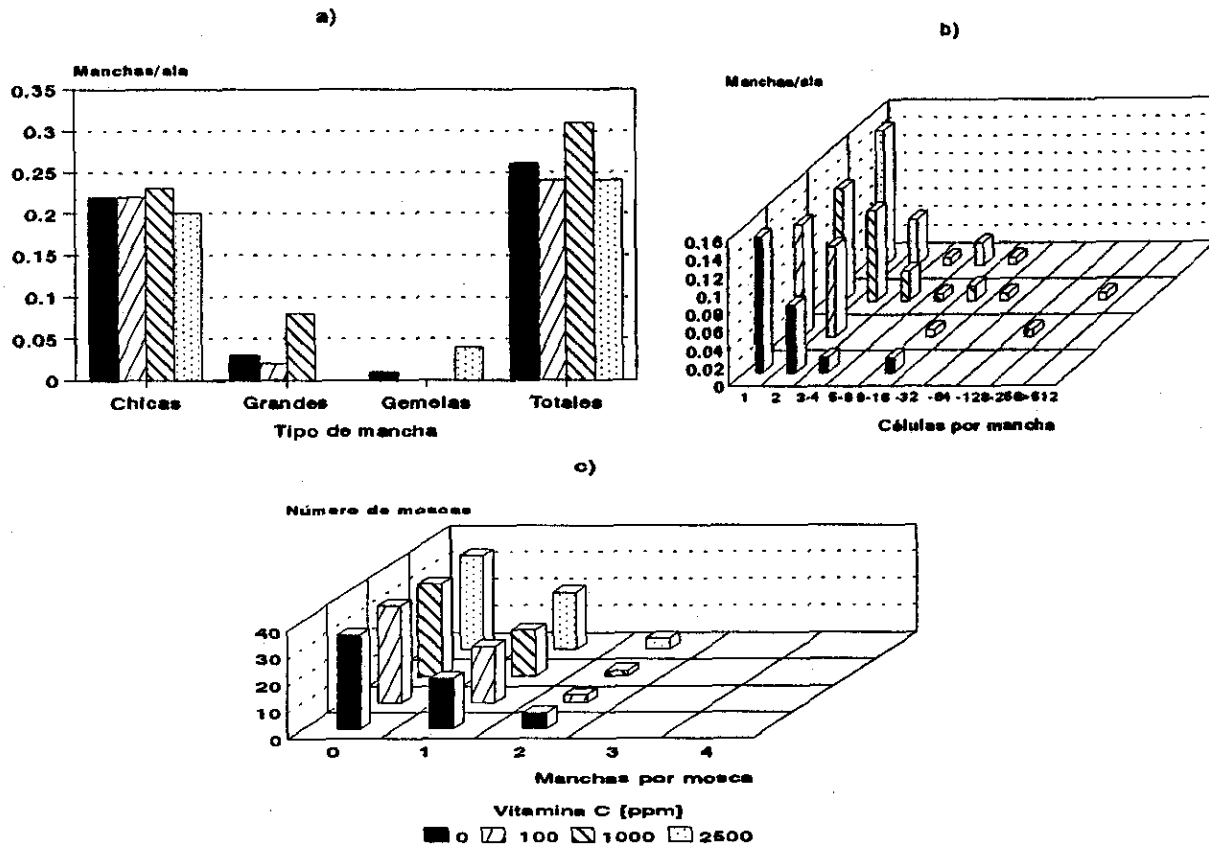


Fig. 42 a) Frecuencia de manchas por ala, b) Frecuencia de células por mancha y c) Manchas por mosca, inducidas por la Vitamina C (48 X 6).

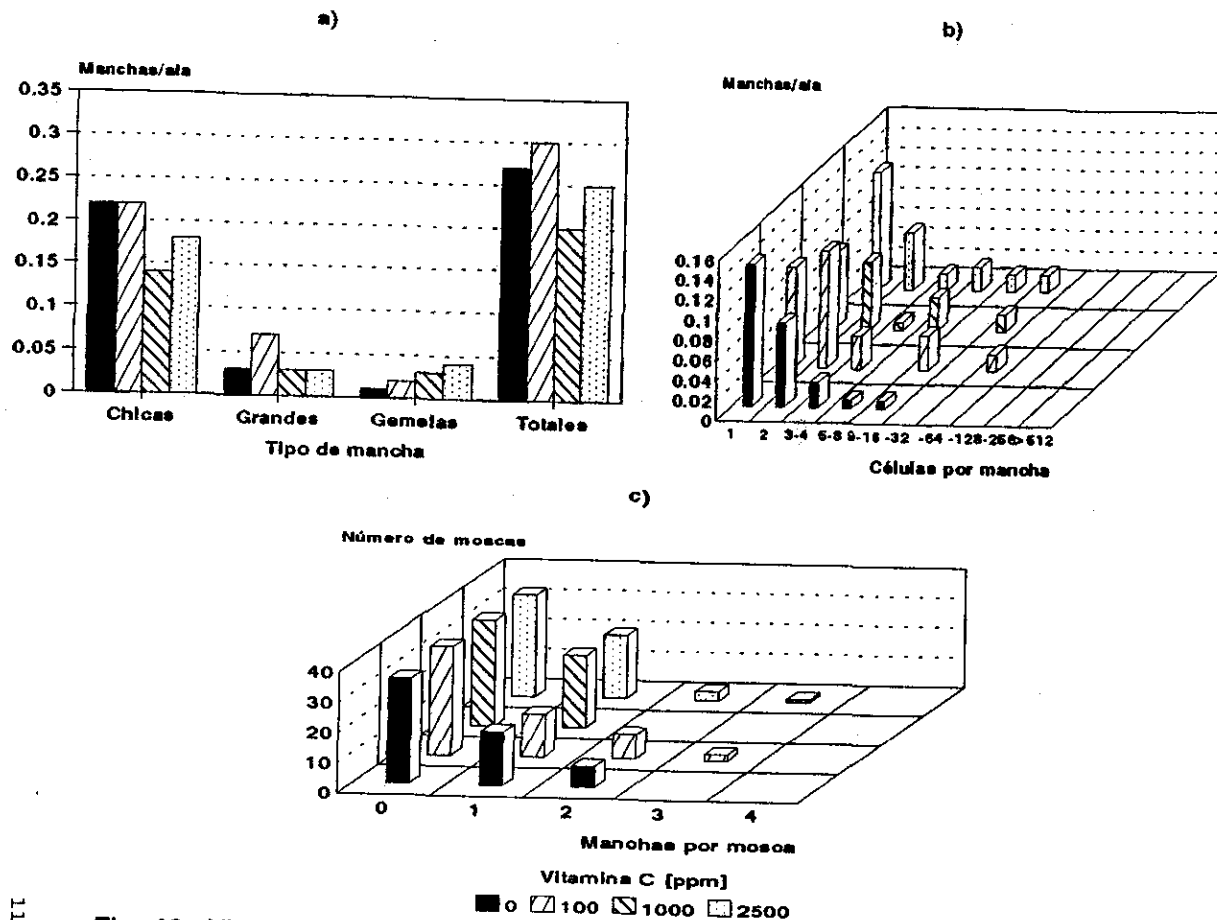


Fig. 43 a) Frecuencia de manchas por ala, b) frecuencia de células por mancha y c) Manchas por mosca, inducidas por la Vitamina C (6 X 48).

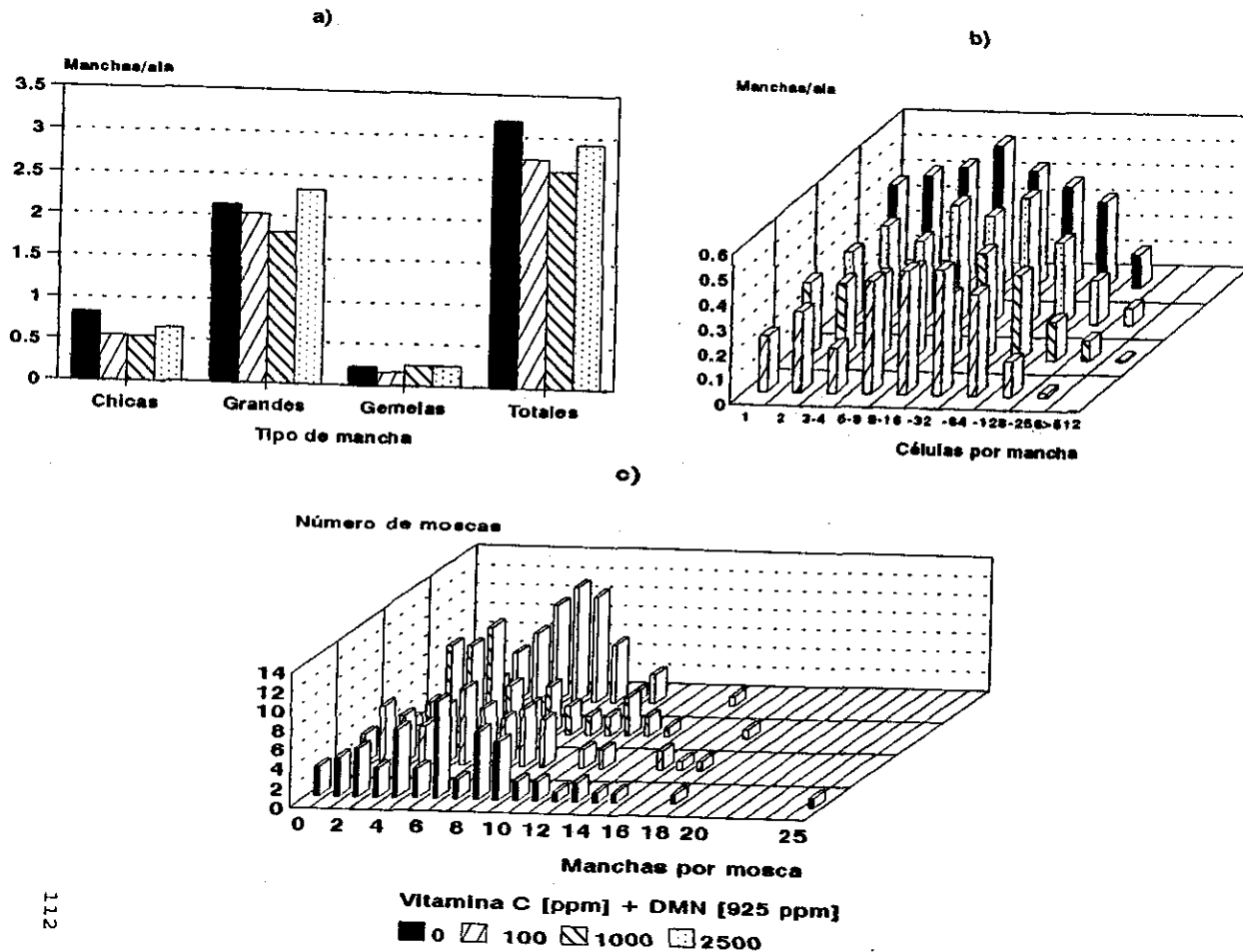


Fig. 44 a) Frecuencia de manchas por ala, b) Frecuencia de células por mancha y c) Manchas por mosca, inducidas por Vitamina C + DMN (48 X 6).

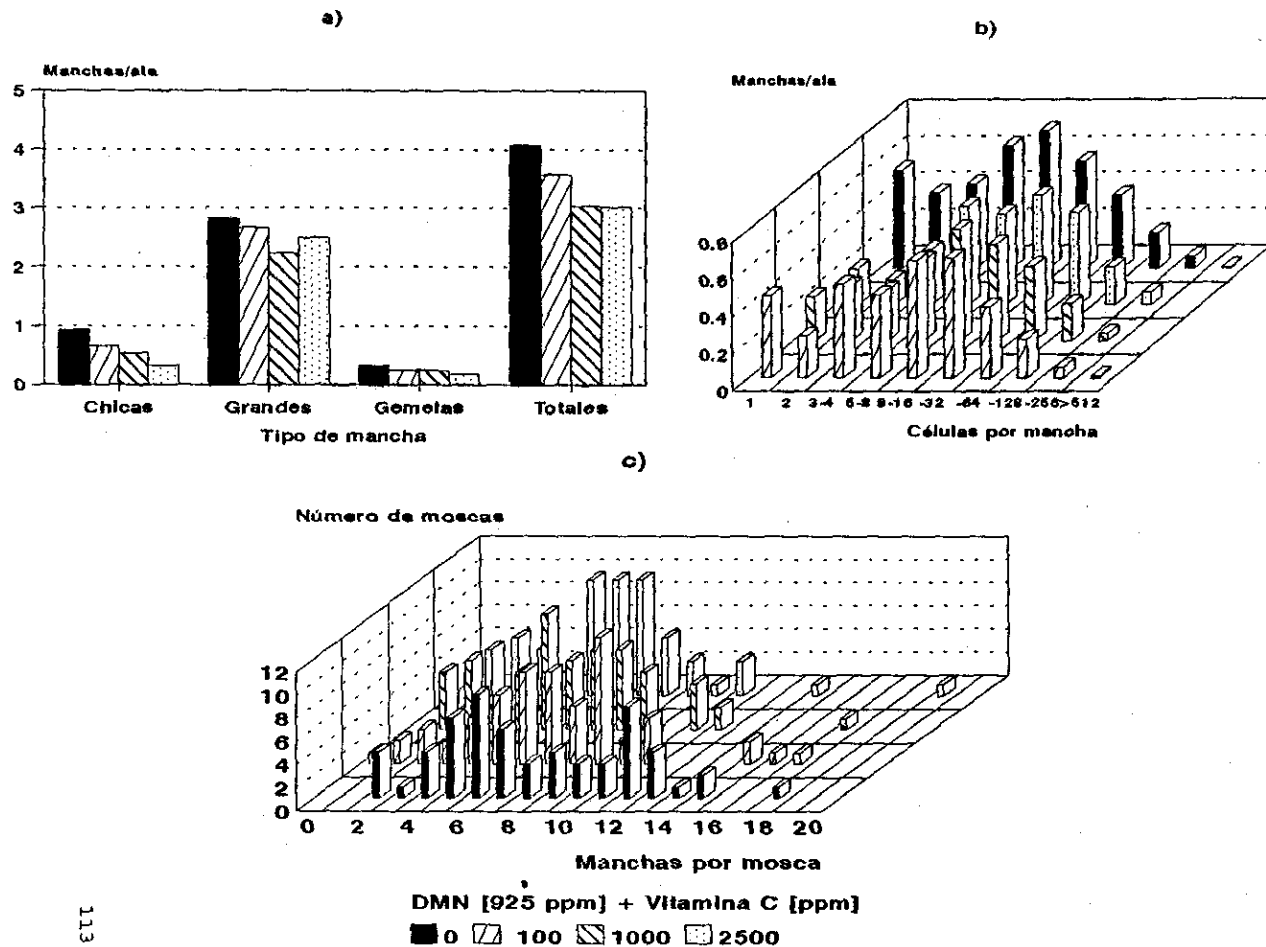


Fig. 45 a) Frecuencia de manchas por ala, b) Frecuencia de células por mancha y c) Manchas por mosca, inducidas por DMN + Vitamina C (6 X 48).

DISCUSION

Mutagénesis

En la prueba de mutación y recombinación somáticas (SMART), la determinación de la actividad genotóxica de un compuesto está dada por la comparación entre la frecuencia de manchas en las series tratadas y el lote testigo. La magnitud de dicha frecuencia está en relación con el número de células presentes al momento de la exposición al mutágeno, el cual depende a su vez, de la edad de la larva y el número final de células en el adulto (García Bellido y Merriam, 1971; Szabad et al., 1983; Würzler, 1986; Graf y Würzler, 1988).

El análisis de la dispersión en la distribución del número de células por mancha se utiliza como indicador del tiempo de inducción de las manchas recobradas, además de ser indicador en los estudios de antimutagénesis de la fracción celular sobre la que se localiza el efecto del antimutágeno, es decir, si es retrasando el tiempo de inducción, en cuyo caso el efecto se observa como un desplazamiento en la aparición de las manchas grandes con respecto al tiempo de administración del tratamiento; si por otro lado, el antimutágeno interfiere con la inducción de daño secundario (principalmente debido a daño oxidativo), entonces la reducción se localizará en la frecuencia de manchas chicas (que se inducen al final del desarrollo).

El análisis de la dispersión en la distribución del número de manchas por mosca permite determinar la fracción de organismos que están respondiendo al tratamiento, lo que es un indicador de la susceptibilidad individual de los organismos expuestos. Esta distribución tiende a dispersarse ante compuestos que demandan la participación de la actividad metabólica de los organismos expuestos, a través de la cual adquieren actividad mutagénica, pero también son desintoxicados.

La evaluación de genotoxicidad se realizó utilizando larvas del primer y tercer estadio. En el primero, las larvas (de 24 h de edad) se encuentran al principio del desarrollo y, en consecuencia, el número de células blanco es menor que en las larvas de tercer estadio (72 h de edad); sin embargo, el número de divisiones celulares que pueden transcurrir en las células afectadas hasta la metamorfosis es mayor en las primeras que en las segundas. Por otro lado, se ha mostrado que la capacidad de biotransformación metabólica es diferente en relación con la edad de las larvas, siendo más eficiente en las de tercer estadio (Hällstrom et al., 1985).

Comparación de las tres especies de *Ipomoea*.

La resina de la raíz de *I. jalapa* evaluada mediante la prueba de mutación y recombinación somáticas en células de las alas de *Drosophila melanogaster*, no resultó genotóxica para las larvas de primer y tercer estadio, aunque en las primeras mostró una tendencia a reducir la frecuencia basal de manchas por ala. El tiempo de formación de las manchas y la proporción de moscas que presentaron estas manchas tampoco se alteró en presencia de la resina de *I. jalapa*. De esta manera puede considerarse que la edad larvaria al momento del tratamiento no influyó de manera determinante en la respuesta observada.

Este resultado coincide con el encontrado para la resina de *I. purga* (García et al., 1993) y la de *I. orizabensis* (Muñoz-Moya 1994). En la figura 25 se compara la frecuencia de manchas por ala de las moscas tratadas en la etapa de larva de primer y tercer estadio con las tres diferentes resinas. La frecuencia de manchas por ala del testigo negativo que se presenta en la figura es el promedio de las frecuencias de los testigos negativos concurrentes. De las tres resinas, la de *I. purga* es más tóxica para las larvas de tercer estadio, de manera que la concentración más alta que se ha probado de esta

resina es 500 ppm, en comparación con la resina de *I. orizabensis*, de la que se han probado concentraciones más altas [2500 a 6250 ppm] sin ser tóxica para ambos tipos de larva. La resina de *I. jalapa* tampoco resultó tóxica, por lo que en el presente trabajo se seleccionaron concentraciones similares a las probadas en el caso de *I. purga* e *I. orizabensis* [250, 500, 2500 y 5000 ppm], sin observar signos de toxicidad para las larvas expuestas. Así, de manera cualitativa, la toxicidad de las resinas se puede indicar de la siguiente forma: *I. purga* > *I. orizabensis* = *I. jalapa*.

La comparación de la frecuencia de manchas por ala de las tres especies mostró que aunque no hay diferencias significativas entre las concentraciones probadas de cada resina, en las larvas de primer estadio expuestas a la resina de *I. purga*, la frecuencia de manchas por ala fue ligeramente mayor que la de las larvas expuestas a *I. jalapa* y a *I. orizabensis* (Fig. 25a). En comparación, las larvas de tercer estadio tratadas con las diferentes resinas mostraron frecuencias de manchas similares a las del lote testigo (Fig. 25b).

En síntesis, en los dos tipos de protocolos utilizados en el estudio del potencial genotóxico de las resinas del complejo "Raíz de Jalapa", no se encontraron evidencias de acción mutagénica alguna, además de que la edad de las larvas tratadas no modificó de manera significativa la respuesta obtenida.

Antimutagénesis

Para determinar si las resinas del género *Ipomoea* tienen actividad antimutagénica, en el presente trabajo se utilizó un mutágeno de referencia como inductor de daño en *Drosophila*: la N-Nitrosodimetilamina (DMN), un promutágeno monofuncional que al reaccionar con oxígenos y nitrógenos de las bases que

conforman los ácidos nucleicos (excepto el nitrógeno del enlace glicosídico), produce aductos en aproximadamente 20 sitios diferentes (Vogel, 1992); además genera rompimientos en las hebras del ADN, lo que se traduce -a nivel celular-, en actividad recombinogénica dependiente de la concentración; el tiempo de exposición al mutágeno es también un factor importante en el número de células afectadas. En la prueba de mutación y recombinación somáticas, la DMN ha probado inducir todo tipo de manchas (Delgado, 1990; Ordaz, 1991); la concentración elegida [925 ppm] para el tratamiento agudo incrementa de manera significativa la frecuencia de manchas sencillas y gemelas, sin resultar excesivo el número de manchas producido.

Para determinar si las resinas interfieren con la genotoxicidad de la DMN, se comparó la frecuencia de manchas de larvas tratadas con la DMN, en presencia y ausencia de las resinas. El mutágeno se administró durante seis horas (tratamiento agudo) a larvas de tercer estadio (72 h) y la resina durante 48 h (tratamiento crónico). En la determinación del potencial protector de las resinas del complejo "Raíz de Jalapa", se usaron dos tipos de protocolos: en el primero (48 X 6 h), las larvas recibieron primero el tratamiento crónico con la resina (48 h) y después el tratamiento agudo (6 h) con la DMN; en el segundo protocolo (6 X 48 h), el orden de los tratamientos se invirtió.

Comparación de las tres especies de *Ipomoea*.

Ipomoea jalapa

En las larvas tratadas primero con la resina de *I. jalapa* y después con la DMN [925 ppm], se incrementó la frecuencia de todo tipo de manchas de manera significativa y en forma inversa a la concentración administrada (figura 26a). El tratamiento: resina [250 ppm]-DMN, incrementó en 3.5 veces la frecuencia de

manchas simples chicas inducidas por la DMN, y en 2.4 veces la de manchas totales. El menor efecto se detectó en la concentración más alta de la resina [5000 ppm]. La distribución del número de células por mancha fue similar a la inducida por la DMN pero con frecuencias mayores (Fig. 26b). Con respecto a la distribución del número de manchas por mosca, se observó una fuerte dispersión en los lotes tratados con la resina y con la DMN al compararlos con el lote tratado con la DMN, en la que se recobraron moscas que podían presentar desde una hasta 23 manchas por mosca, mientras que en presencia de la resina [250 ppm]-DMN se obtuvieron moscas con 9 y hasta 46 (57, el número más extremo) manchas por mosca (Fig. 26c). Un aspecto que llamó la atención fue que al invertir el orden de los tratamientos no se observó este efecto. La frecuencia de manchas simples y gemelas fue similar a la obtenida en el tratamiento con la DMN (figura 27a). La distribución del número de células por mancha también fue similar entre las series combinadas y el tratamiento con el testigo positivo (figura 27b - c). Sin embargo, se detectó sobredispersión en el número de manchas por mosca en las concentraciones de 2500 y 5000 ppm ($P < 0.05$).

En suma, el tratamiento con la resina previo al tratamiento con la DMN potencia la genotoxicidad de este mutágeno, mientras que la exposición postratamiento con la DMN no tiene este efecto, aunque tampoco reduce el efecto del mutágeno. Estos resultados sugieren la presencia en la resina de uno o varios metabolitos que al interferir con la DMN potencian su efecto, como se ha mostrado el metabolismo de las larvas de primer estadio es menos eficiente que el de las de tercer estadio (Hällstrom et al., 1985), por lo que probablemente estas desintoxican de manera más eficiente a estos residuos del metabolismo de la resina, sin embargo, se requiere de estudios adicionales para aclarar la respuesta obtenida.

Estos resultados difieren de los encontrados por García et al (1993) para *I. purga* y por Muñoz-Moya (1994) para *I. orizabensis* en larvas de *Drosophila*.

Ipomoea purga

La resina de *I. purga* [100 - 250 ppm] redujo la frecuencia de manchas cuando se administra antes que la DMN, sin modificar la distribución del número de células por mancha inducidas por la nitrosamina (excepto a 50 ppm) y sólo en las concentración más alta se modifica la distribución del número de manchas por mosca (Fig. 28a - c). Al exponer a las larvas a los tratamientos en el orden inverso, los resultados obtenidos en presencia de la resina fueron similares al tratamiento sólo con la nitrosamina (Fig. 29a - c). En resumen, la resina de *I. purga* tiene un ligero efecto de protección sólo cuando se administra previo a la nitrosamina, probablemente la diferencia radica también en el metabolismo más eficiente de las larvas de tercer estadio.

Ipomoea orizabensis

Muñoz-Moya (1994) probó bajo las mismas condiciones metodológicas la interacción entre la resina de *I. orizabensis* y la DMN. Sin importar la edad larvaria al tratamiento, la resina de *I. orizabensis* disminuyó de manera significativa la frecuencia de todo tipo de manchas inducidas por la DMN (figuras 30a y 31a). La distribución del número de células por mancha indicó que en ambos protocolos, la reducción en la frecuencia afectó todos los tamaños de manchas recobrados y fue concentración-dependiente (figuras 30b y 31b). Un aspecto sumamente importante es la distribución del número de manchas por mosca, el cual debido al tratamiento con la DMN es de hasta 36 manchas por mosca, sin embargo, conforme se incrementó la

concentración de la resina, el número de moscas con pocas o ninguna mancha se incrementó de manera significativa (Figuras 30c y 31c). En resumen, la resina de *I. orizabensis* tiene un efecto protector de la genotoxicidad inducida por la DMN.

En la figura 32, se muestra comparativamente la frecuencia de manchas por ala de las diferentes resinas en tratamientos combinados con la DMN. Los resultados obtenidos con las tres resinas indican que la participación del metabolismo es fundamental en la respuesta de genotoxicidad observada. Debe recordarse que la DMN es un promutágeno que requiere ser biotransformado a la forma reactiva. Al analizar el efecto particular de la nitrosamina utilizada como testigo positivo (Figuras 30c y 31c), se observó que la susceptibilidad de las moscas que recibieron el mismo tratamiento fue diferente, de manera que mientras que algunas presentaron hasta 36 manchas, otras no mostraron manchas en sus alas. Como en la mayoría de los organismos, en *Drosophila* el metabolismo varía con la edad, siendo más completo en las larvas de tercer estadio que en las del primero; como ocurrió en las moscas tratadas con la resina de *I. jalapa*, la cual potenció fuertemente la genotoxicidad de la DMN en las larvas de primer estadio, pero no en las del tercero. De las tres resinas, sólo la de *I. orizabensis* tuvo potencial antimutagénico ya que mostró reducir la genotoxicidad de la DMN hasta en un 93 % (a 6250 ppm) si se administra previa a la nitrosamina y en un 83 % si se administra después.

En resumen, la resina de *Ipomoea orizabensis* muestra un efecto protector de la mutagenicidad de la N-Nitrosodimetilamina (DMN); en este efecto la edad de las larvas no parece ser determinante.

Como la resina de *Ipomoea orizabensis* es la que mostró tener efecto antimutagénico, la siguiente etapa consistió en tratar de encontrar él o los metabolitos secundarios que pudieran causar el efecto de protección. Para esto se probó la

fracción mayoritaria de la resina aislada en el Laboratorio de Química de la Facultad de Ciencias de la UNAM, a la cual se denominó: resina B. Este metabolito es el componente más abundante de la resina de la raíz de *I. orizabensis*, razón por la que se consideró que esta fracción podría estar relacionada con la actividad de protección observada en las larvas de *D. melanogaster*. Por tal motivo, se probó para su genotoxicidad utilizando los protocolos y condiciones experimentales ya indicados.

La resina B no resultó genotóxica para *Drosophila* en los dos tipos de protocolos utilizados; de igual manera no modificó la distribución del número de células por mancha ni del número de manchas por mosca, estos resultados concuerdan con los reportados por Muñoz-Moya (1994) para la resina total e indican que la resina B no induce, mutación ni recombinación somáticas en *Drosophila melanogaster* (Figs. 33 y 34).

Al evaluar si la resina B de *I. orizabensis* tiene efecto antimutagénico, se encontró que la frecuencia de manchas simples chicas es significativamente menor si la resina se administra antes que la nitrosamina ($P < 0.05$) y es similar a la inducida por el mutágeno positivo si se administra después. La frecuencia de manchas totales fue menor (efecto débil positivo) a la inducida por la nitrosamina en ausencia de la resina (figuras 35 y 36). Al comparar la distribución del número de células por mancha se observó una marcada reducción en la frecuencia de manchas de 1 a 2 células (figura 35b). Estas manchas se producen preferencialmente durante las últimas divisiones celulares, lo que sugiere que una fracción de éstas puede resultar de los metabolitos derivados de la transformación de la nitrosamina, o como producto de daño oxidativo a través de radicales libres. El número de manchas por mosca fue menor conforme se incrementó la concentración de la resina, recobrándose incluso moscas que no presentaron

manchas aún después del tratamiento con la nitrosamina. Este resultado es consistente con la posible actividad antioxidante de la resina B, la cual podría actuar atrapando radicales libres generados durante la transformación a mutágeno de la DMN (Vogel, 1992). Por otro lado, el menor efecto recobrado al invertir el orden de los tratamientos apoya esta posibilidad. Al exponer a las larvas primero a la nitrosamina y después a la resina B, se observó menor frecuencia de manchas a 2500 y 5000 ppm, comparada con la inducida por la DMN; de la misma manera, se incrementó el número de moscas con pocas o ninguna mancha sobre las alas. Así, cuando la resina se administra posterior al mutágeno de referencia, sólo tiene actividad de protección en las concentraciones más altas (Fig. 36).

La comparación de la actividad de la glicoresina B y la resina total derivadas de *I. orizabensis* indica además, que otras de la glicorresinas podrían estar implicadas ya que la actividad de protección observada en la resina total es mayor que la mostrada por la resina B (Figuras 32 y 35).

El siguiente paso en la caracterización del potencial genotóxico de la resina consistió en determinar si el efecto de protección es una propiedad de la resina de *I. orizabensis* o si es una interacción particular con la DMN, para lo cual seleccionaron otros mutágenos de referencia en los que la participación del metabolismo se manifiesta de manera diferente.

***Ipomoea orizabensis* vs. otros mutágenos de referencia**

El efecto antimutagénico de la resina de *Ipomoea orizabensis* se probó con los mutágenos de referencia: Metilmetanosulfonato (MMS) y Mitomicina C (MMC).

Metil-metanosulfonato

El MMS es un agente alquilante de acción directa, es decir, no requiere ser biotransformado por parte del metabolismo del organismo expuesto. Tiende a reaccionar con moléculas neutrales por un mecanismo de asociación S_N2 que consiste en el ataque a los anillos del nitrógeno altamente nucleofílico, además puede producir la formación de aductos, dímeros de timina, entrecruzamiento interhebras, rompimientos sencillos y dobles de hebras por la acción de las bases alquiladas (Fasullo et al., 1994 Horrsfall et al., 1990). En las células somáticas de *Drosophila* induce mutación y recombinación somáticas [1 mM] de manera significativa (Delgado, 1990; Ordaz 1991).

La resina de *I. orizabensis* administrada antes que el tratamiento con el MMS (48 X 6 h), disminuyó de manera significativa la frecuencia de manchas chicas en todas las concentraciones empleadas; redujo la frecuencia de manchas gemelas en las concentraciones de 2500, 5000 y 6250 ppm ($P < 0.05$) (figura 37); y el efecto fue débil positivo para manchas grandes sólo en la concentración de 6250 ppm; de manera global redujo la frecuencia de manchas totales hasta en un 61 %, siendo el efecto estadísticamente significativo a partir de 4375 ppm. La distribución del número de células por mancha mostró que nuevamente la reducción en la frecuencia de manchas se localizó en las manchas chicas (1 a 2 células) (Fig. 37b); también se observó que el número de manchas por mosca se redujo conforme se incrementó la concentración y aumentó la proporción de moscas que no mostraron manchas. El mismo efecto se observó al invertir el orden de los tratamientos, siendo la reducción en la frecuencia de manchas de hasta un 51 % (Fig. 38). Es importante hacer notar que el MMS es un mutágeno directo cuya actividad es prácticamente independiente de la capacidad de activación metabólica de los organismos expuestos y en

consecuencia, se espera menor dispersión en el efecto producido en comparación con la DMN (figura 41).

La diferente naturaleza química de este agente alquilante se manifestó también en la distribución del número de células por mancha, en la que se aprecian frecuencias menores para los diferentes tamaños de mancha, siendo más marcado el efecto para manchas pertenecientes al intervalo de 1 a 16 células (Fig. 38b). Con respecto al número de manchas por mosca, con el MMS se obtuvo menor dispersión que con la DMN, sesgándose la distribución en presencia de la resina hacia pocas o ninguna mancha por mosca (Fig. 38c).

Mitomicina-C

La mitomicina-C (MMC) requiere ser activada metabólicamente antes de que pueda actuar como agente alquilante, el proceso de activación es mediado por la enzima citocromo c-reductasa-NADPH, se reduce a su derivado hidroquinona por una de las enzimas pertenecientes al grupo de quinonas reductasas (diaforasas), esto facilita una protonación del nitrógeno aziridina promoviendo la alquilación intracelular de centros nucleofílicos, (Pan et al., 1984; Keyes et al., 1984; Marshall y Raut, 1986). La MMC actúa como agente alquilante mono o bifuncional, produciendo ligamientos ó enlaces cruzados DNA-DNA ó DNA-proteínas o uniéndose a una base sencilla del DNA por alquilación del O⁶ de la guanina, también puede producir monoadductos en el DNA, proteínas alquiladas y especies citotóxicas de oxígeno (Kennedy et al., 1980; Marshall y Rauth, 1986). En la prueba de mutación y recombinación somáticas la MMC [0.625 mM] ha probado inducir frecuencias de manchas de manera significativa (Grozco, 1993).

De igual manera que en los tratamientos con DMN y MMS, la resina de *I. orizabensis* disminuyó de manera significativa la frecuencia de manchas chicas y totales cuando se administró

previo y posterior a la MMC. Redujo de manera significativa la frecuencia de manchas grandes pero no tuvo efecto sobre las manchas gemelas (figuras 39 y 40). La distribución del número de células por mancha mostró que la reducción afectó prácticamente a todos los tamaños de mancha (figuras 39b y 40b). La reducción en la frecuencia de manchas fué de un 78 % y de un 82 % en el primer y segundo protocolo, respectivamente. Finalmente, la distribución del número de manchas por mosca recobrada con la MMC se modificó en presencia de la resina, sesgándose por la cada vez mayor proporción de moscas con pocas o ninguna mancha (figuras 39c y 40c).

En suma, la resina de *I. orizabensis* mostró reducir el efecto genotóxico de la MMC, probablemente por atrapar radicales libres que se generan durante la biotransformación de este compuesto.

Existe abundante evidencia indicando que las especies con oxígenos activables (oxígeno singulete, radicales peróxido, anión superóxido y radicales hidroxilo) están involucrados en el daño al DNA, así como en la transformación maligna y otros parámetros del daño celular, tanto *in vitro* como *in vivo*; el oxígeno también esta implicado epidemiológicamente en la incidencia de cáncer y enfermedades degenerativas como algunas enfermedades del corazón y cataratas; además del proceso de envejecimiento ya que los radicales libres pueden oxidar las bases del DNA (Sies et al., 1992; Kelloff et al., 1995; Halliwell, 1994; Saran y Bors, 1990). La producción de especies reactivas de oxígeno es común durante el metabolismo de los seres vivos, sin embargo, la producción y uso de éstos en las múltiples reacciones químicas guarda un equilibrio (Sies et al., 1992) que es alterado cuando se presentan factores extraños en el ambiente como puede ser la adición de genotóxicos en la dieta de los organismos. La generación de radicales libres *in vivo* depende de las actividades metabólicas

del organismo; estas reacciones están fuertemente influenciadas por: i) la presencia y concentración de oxígeno; ii) la disponibilidad de metales de transición (efecto de unirse y compartamentalizarse); iii) el nivel de reductantes y antioxidantes (efectos nutricionales). Los efectos de los radicales libres pueden esperarse en: 1) daño a la membrana (afectando el transporte pasivo o activo y alterando las interrelaciones fluido/función, mensaje intercelular a través de modificaciones en la síntesis de prostaglandinas y leucotrenos); 2) daño a proteínas (afectan a los transportadores de membrana, canales protéicos, receptores o reguladores protéicos, inmunomoduladores); y 3) daño al DNA (daño primario y secundario) (Kelloff et al., 1994; Kelloff et al., 1995).

En el caso de los promutágenos, la biotransformación al metabolito reactivo genera una gran cantidad de radicales libres, sin embargo, debe considerarse que éstos se producen también como parte del proceso de desintoxicación.

Al comparar la genotoxicidad de los tres mutágenos de referencia: DMN, MMS y MMC se encuentran diferencias que resultan interesantes (Fig. 41). La DMN y la MMC requieren del metabolismo para ser reactivas, mientras que el MMS no. La genotoxicidad inducida se manifiesta de manera muy diferente en las moscas tratadas. En el caso de la DMN, la variabilidad en la respuesta obtenida fue mayor, siendo esto más evidente en la susceptibilidad individual evaluada a través del número de manchas por mosca; mientras que las distribuciones obtenidas con MMS y MMC son más similares entre sí. La diferente respuesta obtenida es indicativa de la capacidad de discriminación química del sistema *in vivo* de *Drosophila*. Al comparar las distribuciones del número de células por mancha se observan pocas diferencias en éstas; en general, la frecuencia obtenida con la DMN fue mayor ya que también la concentración

utilizada fue mayor.

En los tratamientos con cada uno de los mutágenos de referencia y la resina obtenida de *I. orizabensis*, se observó que la reducción en la frecuencia de manchas se localizó principalmente en las manchas chicas. Resulta interesante comparar las distribuciones de la DMN y la MMC en las que la resina reduce efectivamente casi todo tipo de tamaño de mancha, y la correspondiente al MMS en la que el efecto se restringe a las manchas chicas y prácticamente no modifica la distribución de manchas de más de 3 células. Lo anterior permite señalar varios aspectos:

1. Las manchas recobradas en las alas de *Drosophila* son producto del metabolismo ordinario de la mosca, de la actividad química del genotóxico en cuestión, y de la activación/desintoxicación del genotóxico.
2. La actividad protectora de la resina se manifiesta principalmente por la reducción en la frecuencia de manchas chicas de las moscas tratadas.

Lo anterior apoya el planteamiento anterior de que la resina reduce básicamente manchas ocasionadas por daño oxidativo, por lo que al comparar la magnitud de la reducción puede proponerse que en la genotoxicidad de los compuestos seleccionados, la contribución de este tipo de daño a la frecuencia total de manchas sería: $DMN > MMC > MMS$.

La resina de la raíz de *I. orizabensis*, es una mezcla compleja de diversos constituyentes y no es posible aún adjudicarle a alguno de ellos, o a la interacción particular de varios, el potencial antimutagénico que se ha determinado; además, el diseño genético de la prueba de mutación y recombinación somáticas no permite discernir el momento y el mecanismo de acción de la resina; no obstante, el análisis de las frecuencias de células por manchas y del número de manchas

por mosca puede proporcionar información sobre el posible mecanismo por el que actúa la resina de *I. orizabensis*.

El efecto protector observado al aplicar los dos protocolos sugiere que la resina *I. orizabensis* actúa como desmutágeno, y es efectivo tanto cuando se administra previo al mutágeno de referencia, así como después de éste; en apariencia, la resina bloquea el daño indirecto o secundario ocasionado durante: el proceso de biotransformación del promutágeno, la interacción del mutágeno con otras moléculas biológicas y, el proceso de desintoxicación inducido por la presencia del mutágeno. Los componentes de la resina podrían atrapar los radicales libres generados en cualquiera de los procesos indicados impidiendo que lleguen al DNA, o atrapando prooxidantes, lo que no permitiría la formación de nuevos aductos de manera secundaria.

Por otro lado, la resina de *I. orizabensis* pudiese estar activando enzimas involucradas en la desintoxicación, entre ellas la superóxido desmutasa, la catalasa y la glutatión peroxidasa, entre otras; o estar inhibiendo el metabolismo del ácido araquidónico, de la ornitina descarboxilasa y de la proteína cinasa C, las cuales están relacionados íntimamente con la mutagénesis.

Con la finalidad de tener elementos adicionales que apoyen la sugerencia de que la resina de *I. orizabensis* actúa atrapando radicales libres (antioxidante); se probó la actividad antioxidante de la Vitamina C bajo las mismos parámetros experimentales, bajo la hipótesis de que el efecto antioxidante de la vitamina C protegería, del efecto de los mutágenos siguiendo un patrón general similar al obtenido con la resina de *I. orizabensis*.

Los antioxidantes como la Vitamina C, reaccionan con los radicales libres, sobre todo con los peróxidos, y el oxígeno singulete (Sies et al., 1992; Cozzi et al., 1997; Odin, 1997).

Vitamina C

El primer paso fue determinar si la vitamina C tiene actividad genotóxica *per se*. Los resultados obtenidos no mostraron diferencias significativas en las frecuencias de manchas por ala entre los lotes experimentales y su testigo negativo (figuras 42 y 43), de igual manera no se recobraron diferencias significativas en las distribución del número de manchas por mosca. En relación con el número de células que forman cada mancha se encontraron manchas de un tamaño ligeramente mayor en los lotes tratados con la vitamina C.

La administración de la Vitamina C antes que el mutágeno de referencia (DMN), dió un efecto débil positivo sólo para manchas chicas; la frecuencia de distribución del número de manchas no se modificó en ninguna de las concentraciones; sólo la frecuencia de distribución para el número de manchas por mosca en las concentraciones de 1000 y 2500 ppm fué alterada ($P < 0.05$) (Fig. 44). Como se esperaba, el efecto antioxidante de la vitamina C se localizó en las manchas chicas.

Cuando se administró primero la DMN y después la Vitamina C, la frecuencia de manchas chicas se redujo de manera significativa, aunque al sumar todas las manchas sólo se obtuvo un diagnóstico débil positivo a 1000 y 2500 ppm; la dispersión en la distribución del número de células por mancha y la distribución del número de manchas por mosca fue menor en presencia de la vitamina C en todas las concentraciones probadas (figura 45).

El efecto antioxidante de la Vitamina C se reflejó en la reducción del número de manchas chicas, previniendo el daño que pudiese provocar la DMN en los últimos estadios del desarrollo de *Drosophila melanogaster*; esto indica que podría actuar también protegiendo del daño secundario generado por la DMN.

A pesar de que los resultados obtenidos apoyan la idea de que la resina de *I. orizabensis* actúa como un desmutágeno

antioxidante, no es posible hacer una comparación del mecanismo protector de la Vitamina C y el de la resina de *I. orizabensis*; sin embargo, de manera aparente la resina fue más efectiva que la vitamina C, ya que ante la misma concentración del mutágeno, protege a las larvas cuando se le aplica antes y después de los diferentes mutágenos de prueba, no obstante, se desconoce la equivalencia molecular de ambos compuestos ya que la resina es una mezcla de varios componentes.

La prueba de mutación y recombinación somáticas en este estudio mostró que además de ser económica, sensible y específica, es una de las más versátiles, ya que permite además estudiar sustancias o combinaciones de éstas para determinar la acción antimutagénica de las mismas. Por otro lado, ya que ha sido probado que la SMART de *Drosophila melanogaster* detecta carcinógenos -a través de la asociación entre carcinogénesis y actividad recombinogénica-, éste puede ser un tamiz preliminar para identificar posibles anticarcinógenos, a un costo relativamente bajo y en un tiempo reducido.

Estos resultados permiten considerar que los objetivos iniciales del trabajo fueron cubiertos; los componentes de la raíz de *Ipomoea orizabensis*, forman un extracto, que tiene actividad protectora contra la mutagenicidad de la N-Nitrosodimetilamina (DMN), el Metil-metanosulfonato (MMS) y la Mitomicina C (MMC); aparentemente el efecto es debido a más de un componente.

La inhibición de la genotoxicidad de los mutágenos se mostró únicamente con una concentración por lo que es necesaria la evaluación de estos protocolos utilizando diferentes concentraciones de los mutágenos empleados para definir el rango de inhibición, por parte de la resina.

CONCLUSIONES

1. Ninguna de las tres especies pertenecientes al complejo "Raíz de Jalapa" fue genotóxica en las larvas de primer y tercer estadio; de igual manera la resina B purificada de *Ipomoea orizabensis* no fue genotóxica en los protocolos empleados.
2. La resina de *Ipomoea orizabensis* protege a *Drosophila melanogaster* de la genotoxicidad inducida por la N-Nitrosodimetilamina, el Metil-metanosulfonato y la Mitomicina C, administrada antes y después de los mutágenos.
3. La protección observada fue dependiente de la concentración.
4. La resina de *I. jalapa* no tiene actividad antimutagénica cuando se administra después de la DMN y aumenta la frecuencia de daño inducido por la DMN cuando se administra previo a éste.
5. La resina de *I. purga* no tiene efecto antimutagénico en contra de la DMN.
6. La resina B de *Ipomoea orizabensis* tiene efecto antimutagénico cuando se administra antes que la DMN.
7. Se sugiere con base en los resultados obtenidos que resina de *Ipomoea orizabensis* tiene un efecto antimutagénico (desmutágeno) al reducir el daño oxidativo que resulta de la actividad de los diferentes mutágenos de referencia.

8. La prueba mutación y recombinación somáticas de *Drosophila melanogaster* es útil para detectar compuestos con actividad genotóxica y/o protectora, así como analizar interacciones entre varias sustancias de interés; también puede ser utilizada como tamiz preliminar en la búsqueda de anticancerígenos.

BIBLIOGRAFIA

- Adler, I.D. (1981) Comparative mutagenicity of mitomycin C. **En: Comparative chemical mutagenesis** (F.J. De Serres y M.D. Shelby, eds.) Plenum Press, Nueva York. pp. 993-1040.
- Albert, L.A. (1988) **Curso básico de toxicología ambiental**. Limusa. México. 331 pp.
- Alvarez, A.H. (1986) **Diccionario de herbolaria**. Posada. México. 314 pp.
- Ames, B.N. (1983) Dietary carcinogens and anticarcinogens. **Science** 249:970-971.
- Ames, B.N. (1986) Carcinogens and anticarcinogens. **En Antimutagenesis and Anticarcinogenesis: Mecanismos** (T. Kada y A. Hollaender eds.) Plenum Nueva York. pp 7-35.
- Arcos, J. C; M.F. Argus; D.Y. Lai y Y.T. Woo (1995) Chemical induction of cancer. **En: Chemical induction of cancer** (J.C Arcos ed.) Birkhauser Boston pp 316-330.
- Arditti, R.R. y G. Sermonti (1962) Modification by manganous chloride of the frequency of mutation induced by nitrogen mustard. **Genetics** 47:761-768.
- Aukerman, S.L; R.B. Brunet; J. Hilton y P.E. Hartman (1983) Effect of plasma and carboxylalsterase on the stability, mutagenicity and DNA cross-linking activity of some directing N-nitroso compounds. **Cancer Res.** 43:175-181.

- Autoun, M.D; D. Abramson; R.L.Tyson; C. Chang; J.L. McLaughlin; G.Peck y J.M. Cassady (1981) Potential antitumor agents. XVII. Physalin B and 25, 26-Epidihydrophysalin C from *Witheringia coccoloboides*. *Journal of Natural Products*. 5:579-585.

- Ayala J.F. y A. J. Kiger (1984) *Genética Moderna*. Omega. Barcelona 836 pp.

- Baars, A.J; W.G.H. Bliejleven; G.R. Monh; A.T. Natarajan y D.D. Breimer (1980) Preliminar studies on the ability of *Drosophila* microsomal preparations to activate mutagens and carcinogens. *Mutat. Res.* 72:257-264.

- Baker, B.S; A.T.C. Carpenter y P. Ropoll (1978) The utilization during mitotic cell division of loci controlling meiotic and disjunction in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*. 90:531-578.

- Bauser, S. C. (1937) A review of some medicinal plants. *Torreya*. 37 (2): 25-32.

- Becker, H.J. (1976) Mitotic recombination. En: *The genetic and biology of Drosophila*. (M. Ashburner y E. Novitski, eds.). Academic Press. Nueva York. Vol. 10, pp 1019-1087.

- Bieber, D.S; A.D.S. Alves; L.R.M.O. Correa; A.C. De Andrade; D.N.S. Carneiro; I.A: De Souza; J.F. De Mello y H.J. Veith (1986) Anticancer and antimicrobial glycosides from *Ipomoea bahiensis*. *Phytochemistry*. 25:1077-1081.

- Bilkin M. y D.B Fitzgerrald (1952) Tumor-Damaging capacity of plants materials. I. Plants used as catathartics. *J. Nat.*

Cancer. Inst. 13:139-149.

- Bhaukuni, D.S; M.L. Dhar; M.M. Dhar; B.N. Dhawan y B.N. Mehrotra (1969) Screening of Indian plants for biological activity II. *Indian J. Exp. Biol.* 7:250.
- Brusick, E.W. (1987) **Principles of genetic Toxicology.** 2a. ed. Plenum Press Nueva York 204 pp.
- Cabrera, G.L. (1975) **Yerbario mexicano.** Gómez Gómez Hnos. Eds. México 239 pp.
- Carr, B.J. (1985) Chemical carcinogens and inhibitors of carcinogenesis in the human diet. *Cancer* 55: 218-224.
- Casarett, L.J. (1975) Origin and scope of Toxicology. **En: Toxicology, the basis science of poison.** (L. J. Casarett y Doull eds). Nueva York. MacMillan Pub. 3-17 pp.
- Castañeda, S.A.N. (1988) **Estudio del efecto de la nemorona y la desmetil- fruticulina sobre la pérdida parcial y total de cromosomas (SCLT) en *Drosophila melanogaster*.** Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias U.N.A.M. pp 14.
- Clark, C.H. (1965) Methionine as an antimutagenesis in *Schizosaccharomyces pombe*. *J. Gen. Microbiol.* 39:21-31.
- Clark, C.H. y D.M. Shanckel (1975) Antimutagenesis in microbial systems. *Bacteriol. Rev. Rev.* 39:33-53.
- Clements J; D. Howe; M. Phillips y N. K. Todd (1988) The *Drosophila* wing test: A comparison to the sensitivity of different strains. *Mutat. Res.* 203:117-123.

- Combs, G.F. (1995) The vitamins: Fundamental aspect in nutrition and health En: **Chemical induction of cancer** (J.C Arcos ed.) Birkhauser Boston pp 316-330.
- Cozzi R; R. Ricordy; V. Gatta; P. Perticome y R. De Salvia (1997) Ascorbic acid and beta-carotene as modulator of oxidative damage. **Carcinogenesis** 18:223-228.
- Cunha, K.S; M. L. Reguly; L. Gimmler; M. Lehman y H.H. de Andrade (1994) Co-mutagenic effect of tannic acid on ring X chromosome loss induced by mitomycin C in sperm cell of *Drosophila melanogaster*. **Mutat. Res.** 308:143-148.
- Darroudi, F; A.T. Natarajan y P.H. Lohman (1989) Cytogenetical characterization of UV-sensitive repair-deficient CHO cell line 43-3B. II. Induction of cell killing, chromosomal aberrations and sister-chromatid exchanges by 4NQO, mono- and bi-functional alkylating agents. **Mutat. Res.** 212:103-112.
- Del Amo, R.S. (1979) **Plantas medicinales del estado de Veracruz**. Instituto Nacional de Investigaciones sobre Recursos Bióticos Veracruz. México. 279 pp.
- De Andrade H.H; J. H. Santos; M.C. Gimmler-Luz; M.J. Correa; Lehmann M. y Reguly M.L. (1992) Suppressing effect of vanillin on chromosome aberration that occur spontaneously or are induced by mitomycin C in the germ cell line of *Drosophila melanogaster*. **Mutat. Res.** 279:281-287.
- De Flora, S. y C. Ramel (1988) Mechanism of inhibitors of mutagenesis and carcinogenesis. Clasification and overview. **Mutat. Res.** 202:285-306.

- Delgado, R.A. (1990) **Daño inducido por mutágenos positivos en células del ala de *Drosophila melanogaster***. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias. UNAM. 75 pp.
- Demerec, M. (1965) **Biology of *Drosophila***. Hafner Publishing Co. Nueva York. 633 pp.
- De Serres, F.J. (1979) Evaluation of test for mutagenicity as indicator of environmental mutagens and carcinogens. **Ann. N.Y. Acad. Sci.** 84:75-84.
- Environmental Mutagen Society (1976) Environmental mutagen hazard. **Science** 186:503-514.
- Estrada, E. (1985) **Jardín botánico de plantas medicinales** Maximo Martínez. Universidad Autónoma de Chapingo 41 pp.
- Evans; Ch.W. (1991) **Farmacognosia**. Interamericana McGraw-Hill. México. 901 pp.
- Fahmy, M y G. Fahmy (1961) En: Vogel, E.W. y A.T. Natarajan (1979 b) The relation between reaction Kinetics and mutagenic action of mono-functional alkylating agents in higher eukaryotic systems. II: Total and partial sex chromosome loss in *Drosophila*. **Mutat. Res.** 62:101-123.
- Fasullo, M; P. Dave y R. Rothstein (1994) DNA-damaging agents stimulate the formation of directed reciprocal translocations in *Sacchomyces cerevisiae*. **Mutat. Res.** 314:121-133.
- Frei, H. y F.E. Würigler (1988) Statistical methods to decide whether mutagen test data from *Drosophila* assays indicate a positive, negative or inconclusive result. **Mutat. Res.** 203:

297-308.

- Ganong, G. (1991) *Fisiología Medica Interamericana* Mcgraw-hill. México. 780 pp.
- García, G.C; L.J. Maldonado; V.R. Márquez; O.A. González; C.E. González; C.J. Rangel; P.F. Rosas; G.C. Saldaña; I.L. Moreno; M.P. Reyes; M.S. García; M.A. Muñoz; B.A. Nieto; R. N. Miranda; R.M. López; P.R. Gutiérrez; T.G. Ordaz y M.P. Morales (1991) **Determinación de la capacidad antimutagénica de extractos de *Tagetes filifolia* en células del ala de *Drosophila melanogaster*.** Curso de Biología de Campo. Facultad de Ciencias U.N.A.M.
- García-Bellido, A. y J.R. Merriam (1971) Parameters of the wing imagal disc development of *Drosophila melanogaster*. *Dev. Bio.* 24:61-87.
- García-Bellido, A. y J. Dapena (1974) Induction, deletion and characterization of cell differentiation mutant in *Drosophila*. *Molec. Genet.* 128:117-130.
- García C.A; A. Muñoz; J. Castro y S. Casas (1993) **Determinación de la actividad mutagénica y antimutagénica y desmutagénica de extractos de la raíz de *Ipomoea purga* mediante el empleo de células somáticas de *Drosophila melanogaster*.** Curso de Biología de Campo. Facultad de Ciencias U.N.A.M.
- Gaytan O.J.C. (1993) **Modulación del efecto genotóxico de la mitomicina C (MMC) por las vitaminas A y C en células somáticas del ala de *Drosophila melanogaster*.** Tesis de Maestría. Facultad de Ciencias. UNAM. 71 pp.

- Graf, U; E. Würgler; A.J. Katz; H. Frei; H. Juon; C.B. Hall y P.G. Kale (1984) Somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Environ. Mutagen.* 6:153-188.
- Graf, U. y F.E. Würgler (1988) The sex-linked recessive lethal assay and recombination test in *Drosophila melanogaster*. En: *Evaluation of short term tests for carcinogens* (J. Ashby et al. eds). Cambridge UK-WHO/Cambridge University Press. Vol. 2. pp 2.301-2.309.
- Grigg, G.W. y J. Stuckey (1966) The reversible suppression of stationary phase mutation in *Escherichia coli* by caffeine. *Genetics* 53:823-834.
- Halliwell, B (1994) Free radicals and antioxidants: a personal view. *Nutr. Rev.* 52:253-265.
- Hällstron, I; J. Magnusson y C Ramel (1982) Relation between the somatic toxicity of dimethylnitrosamine and genetically determined variation in the level induction of citochrome P450 in *Drosophila melanogaster*. *Mutat. Res.* 92:61-168.
- Hartman, P. (1981) The aging process. *Proc Natl. Acad. Sci (USA)* 78:7124-7128.
- Hashimoto, T; K. takeuchi; S. Ohno; S. Komatsu y Y. Ohno. (1987) Cytogenic analysis of dominant lethal effects of mitomycin C and ethy methanesulfonate. *J. Toxicol. Sci.* 12:33-45.
- Heflich R. H (1991) Chemical mutagens. En: *Genetic Toxicology*. (P.L. Albert y R.H Heflich eds) CRC Press, Boca raton (boston) pp 143-202.

- Hellman, K (1972) Anticancer drugs. *Chem. Brit.* 8:69-72.
- Hengevel, L. (1989) **Dynamics of biological invasions**. Chapman and Hall Eds. Gran Bretaña 160 pp.
- Hernández, M.R. y M.J. Gally (1981) **Plantas medicinales**. Arbol. México. 254 pp.
- Hodgson, E. y R. Randy (1991) Insect cytochrome P450. **En: Molecular aspect of monooxygenases and bioactivation of toxic compounds**. (Arinc, E; J. B. Schenkman y E. Hodgson eds). Vol 202. Plenum Press. Nato Series. pp 75-91.
- Horsfall, J.M; J.E. Burns; M. Zielenska; G.M.E. van der Vliet y B. W. Glickman (1990) Mutational specificity of alkylating agents and the influence of repair. *Env. and Molec. Mutag.* 15:107-122.
- Iannuzzi L; G.P. Di Meo; A. Perucatti y L. Ferrara (1990) Mitomycin C induced sister chromatid exchange in X chromosomes of Bovidae. *J. Hered* 81:78-80.
- Index Merck (1989) **Encyclopedia of chemical and drugs**. Published by Merck and Co; Inc. Rahway. Nueva York. 11 ed. 1606 pp.
- Ito, Y; K. Fujie; S. Matsuda; R. Takahashi y S. Maeda (1994) Long-evans A y C rat strain susceptible to clastogenic effects of chemicals in the bone marrow cells. *Jpn. J. Cancer Res.* 85(1):26-31.
- Jacobs, M.M; T.S. Mathey y C.A. Griffin (1977) Inhibitory effects of selenium on the mutagenicity of 2-acetylfluorene

- (AAF) and AAF derivatives. *Cancer Lett.* 2:319-322.
- Jaúregi, F.M. (1985) Algunos purgantes indígenas. *La Naturaleza* 7(14):104-113.
 - Kada, T., T. Inoue (1978) Antimutagenic actions of vegetable factor (s) on the mutagenic principle of tryptophan pyrrolisate. *Mutat. Res.* 53:351-353.
 - Kada, T y H. Mochizuki (1981) Antimutagenic activities of human placental extract on ultraviolet light-and-gamma-ray-induced mutation in *Escherichia coli* WP 2 B/r trp. *J. Radiant. Res.* 22:297-302.
 - Kada, T; T Inoue y N. Namiky (1982) En: *Enviromental mutagenesis and plant biology*. (E.J. Klekowski, ed). Praeger, Nueva York, pp. 137-151.
 - Kelloff G.J; C. W. Boone; V.E. Steele; J.A. Crowell; R. Lubet y C.C. Sigman (1994) Progress in cancer chemoprevention: perspectives on agents selection and short-term clinical intervention trials. *Cancer Res.* 54(7):2015s-2024s.
 - Kelloff G.J; C. W. Boone; V.E. Steele; R. Judith y C.C. Sigman (1995) Inhibition of chemical carcinogenesis. En: *Chemical induction of cancer* (J.C Arcos ed.) Birkhauser Boston 73-109 pp.
 - Kennedy, K.A; S. Rockwell y A.C. Sartorelli (1980) Preferential activation of mitomycin C to cytotoxic metabolites by hipoxic tumor cell. *Cancer Res.* 40:2356-2360.

- Keyes, K.A; P.M. Fracasso; D.C. Heimbroock; S. Rockwell; S.G. Sligar y A.C. Sartorelli (1984) Role of NADPH: cytochrome c reductase and DT-Diafhorase in the biotransformation of mitomicin C. *Cancer Res.* 44:5638-5643.
- Kim J y R.E. Levin (1986) Mechanism of caffeine repression of mitomycin C induced reversion in *Salmonella typhimurium* strain TA94. *Microbios* 53:93-99.
- Klaassen, C.D. (1975) Absortion, distribution and excretion of toxicans En: *Toxicology, the basic science of poisons.* (L.J. Casarett y J. Doull eds.) Macmillan Pub. Nueva York. Co. pp 26-44.
- Krebs, J.K. (1988) *Estudio y distribución de la abundancia.* Ed. Harla. México 753 pp.
- Kulkarni, A.P. y E. Hodgson (1980) Multiplicity of cytochrome P450 in microsomal membranes from the housefly *Musca domestica*. *Biochem. Biophys. Acta.* 263:573-588.
- Laval J; S. Boiteux y T.R. O'Connor (1990) Physiological properties and repair of apurinic/apyrimidic sites and imidazole ring opened guanine in DNA. *Mutat. Res.* 233:73-79.
- Lawley, P.D. (1984) *Carcinogenesis by alkylating agents* En: *Chemical carcinogens.* (C.E. Searle Ed.) American Chemical Society. Vol. 1. Washington, D.C. 325-484 pp.
- Lee, K.S; K. Tagahara; H. Suzuki; R.Y. Wu; M. Haruna y I.H. Hall (1981) Antitumor agents . 49. Tricin, Kaempferol-3-O-B-D Glucopyranocide and (+)-Nortrachelogenin, antileukemic principles from *Wikstroemia indica*. *J. Nat. Prod.* 5:530-535.

- Lee, K.S; H. Nozaki; I.H. Hall; R. Ryoji; T. Hirayama; H. Suzuki y R.Y. Wu. (1982) Antitumor agents 60 Maytansine, an antileukemic principle from *Maytenus diversiflora*. *J. Nat. Prod.* 4:509-510.

- Leutzinger, Y. Richie J. P. The effect of animal age on tumor induction. **En: Chemical induction of cancer** (J.C Arcos ed.) Birkhauser Boston pp 373-395.

- Lim y Snider (1974) **En: Vogel, E.W. y A.T. Natarajan (1979 b)** The relation between reaction Kinetics and mutagenic action of mono-functional alkylating agents in higher eukaryotic systems. II: Total and partial sex chromosome loss in *Drosophila*. *Mutat. Res.* 62:101-123.

- Lindsley, D.L. y R. Grell (1968) **Genetic variations of *Drosophila melanogaster***. Carnegie Institution of Washington Publication Washington. 472 pp.

- Lindsley, D.L. y G. Zimm (1990) The genome of *Drosophila melanogaster*. Parte 4: Genes L-Z, balancers, transposable elements. *Dros. Inf. Serv.* 68:382.

- Liu y Lim (1975) **En: Vogel, E.W. y A.T. Natarajan (1979 b)** The relation between reaction Kinetics and mutagenic action of monofunctional alkylating agents in higher eukaryotic systems. II: Total and partial sex chromosome loss in *Drosophila*. *Mutat. Res.* 62:101-123.

- Loprieno, N. (1980) General principles of genetic toxicology and methods for mutagenesis assessment. **En: The Principles and Methods Modern Toxicology.** (C.L. Galli; S.D. Murphy y R. Paoletti, eds.) Elsevier, Holanda.

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

- Marshall, R.S y A.M. Rauth (1986) Modification of the cytotoxic activity of mitomycin-C by oxigen and ascorbic acid in chinese hamster ovary cells and a repair-deficient mutant. **Cancer Res.** 46:2709-2713.

- Martínez, M. (1969) **Las plantas medicinales de México** Ed Botas. México 423 pp.

- Mathews C.K. y K.E. van Holde (1990) **Biochemistry** Benjamin/Cummings. USA. 1129 pp.

- Mayer, V.W y W.G. Flam (1975) Legislated and technical aspect of mutagenicity test. **Mutat. Res.** 29:295-300.

- Mita, S; Y. Yamazoe; T. Kamtaky y R. Kato (1982) Effects of acid ascorbic on the nonenzymatic binding to DNA and mutagenicity of N-hydroxylated metabolite of a tryptophan-pyrolisis product. **Biochem. Biophys. Res. Com.** 105:1396-1401.

- Mitscher, L.A; S. Drake; S.R. Gollapudi; J. Harris y D.M. Shankel (1986) Isolation and identification of higher plants agents active in antimutagenic assay systems: *Glycyrrhiza glabra*. **En: Antimutagenesis and anticarcinogenesis: Mechanisms** (Shankel T. eds) Plenium, New York pp. 153-165.

- Mochizuky, H y T. Kada (1982) Antimutagenic action of mammalian placental extracts on mutations induced in *Escherichia coli* by UV radation, gamma rays and N-methyl-N'-

- nitro-N-nitrosguanidine. *Mutat. Res.* 95:454-457.
- Mollet, P. y F.E. Würgler (1974) Detection of somatic recombination and mutation in *Drosophila*: a method for testing genetic activity of chemical compounds. *Mutat. Res.* 25:421-424.
 - Milner, J.A. (1990) Mechanism for nutrition inhibition of carcinogenesis. **En: Nutrition and cancer prevention** (Moon T.E. y M.S. Micozzi, eds.) Dekker, New York, pp 13.
 - Morales-Ramires P; R. Rodriguez-Reyes y T. Vallarino-Kelly (1990) Fate of DNA lesions that elicit sister-chromatid exchanges. *Mutat Res* 232:77-88.
 - Moutschen, J. (1985) **Introduction to genetic toxicology.** Jonh Wiley & Sons. Nueva York. 184 pp
 - Muñoz-Moya J.A. (1994) Caracterización del potencial genotóxico y protector de *Ipomoea orizabensis* en células somáticas de *Drosophila melanogaster*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias. UNAM. 65 pp.
 - Nishioca, H y T. Nunosshiba (1986) Role of enzymes in antimutagenesis of human saliva and serum. **En: Antimutagenesis and anticarcinogenesis: Mechanisms** (Shankel T. eds) Plenum, New York pp. 143-151.
 - Noda, A y M. Ono; K. Miyahera y T. Kawasaki (1987) Resin Glycosides. I. Isolation and structure elucidation of orizabin-I, II, III and IV, genuine resin glycosides from the root of *Ipomoea orizabensis*. *Tetrahedron* 43:3889-3902.

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

● Novic, A. y L. Szilard (1952) Anti-mutagens. *Nature* 170:926-927.

● Obe, G. A.T. Natarajan (1982) Mechanisms of the origin of structural chromosomal aberrations, **En: Sister chromatid exchange test.** (D. Muller, A.T. Natarajan, G. Obe y G. Rohrborn Eds) Thieme stratton Inc. Nueva York. pp 1-5.

● Odin A.P. (1997) Vitamins as antimutagens: advantages and some posibles mecanismos of antimutagenic action. *Mutat. Res.* 386:39-67.

● Ong, T; W.Z. Whong; J. Stewart y H.E. Brockman (1986) Chlorophyllin: a potent antimutagen against enviromental and dietary complex mixtures. *Mutat. Res.* 173:111-115.

● Ordaz, T.M.G. (1991) Valoración de la prueba para detección de mutación y recombinación somática (SMART) en las células del ojo de *Drosophila melanogaster*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias. UNAM. 96 pp.

● Orozco, S.P.G. (1993) Efecto protector de la vitamina E y de los b-Carotenos en contra de la mutagenicidad de la Mitomicina-C (MMC) en la prueba somática de ala de *Drosophila melanogaster*. Tesis de Maestria. Facultad de Ciencias. UNAM. 109 pp.

● Pan, S.S; P.A. Andrews y C.J. Glover (1984) Reductive activation of MMC y MMC metabolites catalysed by NADPH-

cytrocrome P-450 reductase and xanthine oxidase. *J. Biol. Chem.* 259:959-966.

● Pedraza, R.A. (1982) **La raíz de jalapa** INIREB informa. Comunicado N° 54 sobre recursos bióticos del país. México.

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

● Petru, E; Woo Y.T. y M.R. Berger (1995) Modulation by vitamins. **En: Chemical induction of cancer.** (J.C Arcos ed.) Birkhauser Boston 316-330 pp.

● Pratt, W. y M. Rudden (1979) **The anticancer drugs.** Nueva York Oxford University Press. Nueva York. 323 pp.

● Ramel, C. (1986) Deployment of short-term assays for the detection of carcinogens: genetic and molecular considerations. *Mutat. Res.* 168:327-342.

● Ramos, M. P; M.H.M. Abundis; O.J.C. Gaytán; T.M.G. Ordas; S.P.G. Orozco; L.J. Maldonado; A.J. Hernández; C.E. González; M.P. Reyes; M.E.M. Galicia y J.A. Muñoz-Moya (1993) **Manual de laboratorio de genética para *Drosophila melanogaster*.** Mc Graw-Hill. México. 131 pp.

● Rehm, S y D.E. Devor (1993) Acute effects of 4-ipomeanol on experimental lung tumor with bronchiolar or alveolar cells features in syrian hamster or C3H/HeNCr mice. *J. Cancer. Res. Oncol.* 120(1-2):41-50.

- Roberts, D.B. (1986) *Drosophila a practical approach*. IRL Press. Oxford. England. 295 pp.
- Rodríguez-Arnaiz R. y M.P. Ramos (1992) *Drosophila como sistema para detectar agentes genotóxicos*. Serie de Genética: los pequeños manuales. Prensa de Ciencias. Facultad de Ciencias. UNAM. 50 pp.
- Rzendowski, J. (1988) *Vegetación de México*. Ed. Limusa México 432 pp.
- Sainsburry, M. (1979) Natural products in the fight against cancer. *Chem. Brit.* 15:127-130.
- Salmon, S.E. y A.C. Sartorelli (1990) Quimioterapia del cáncer. En: *Farmacología básica y clínica* (B.G. Katzung, ed.). El manual moderno. México.
- Saran, M. y R Bors (1990) Radical reaction in vivo an overview. *Radiant Environ Biophys* 29:249-62.
- Sarin, J.P.S; H.S. Garg; N.M. Khanna y M.M. Dhar (1973) Ipomoeareside: A new glycoside from *Ipomoea leari* with anticancer activity. *Phytochemistry*. 12:2461-2468.
- Sato, T; Y. Ose; H. Nagase y K. Hayase (1987) Mechanism of the desmutagenic effect of humic acid. *Mutat. Res.* 176:199-204.
- Saul, R.L. y B.N. Ames (1986) Background levels of DNA damage in the population. En: *Mechanisms of DNA damage and repair: implications for carcinogenesis and risk assessment*. M.G. Simic; L.Grossman y A.C. Upton, (Eds.), Plenum press, Nueva York. pp 529-536.

● Sevag, M.G. y W.T. Drabble (1962) Prevention of the emergence of drug resistant bacteria by polyamines. **Biochem. Biophys. Res. Comm.** 8:446-452.

● Shamberger, R. (1982) Vitamins, nutrition and cancer. **Cancer Bull.** 34:150.

● Shankel D.M. (1991) Antimutagens **En: Genetic Toxicology.** (P.L. Albert y R.H Heflich Eds) CRC Press, Boca raton (boston) pp 339-357.

● Sidney, S. y P. Mirsvish (1986) Effects of vitamins C and E on N-Nitroso compound formation, carcinogenesis, and cancer. **Cancer** 58:1824-1850.

● Sies, H; W. Stahl y A.R. Sundquist (1992) Antioxidant function of vitamins. Vitamins E, C, Beta-carotene, and other carotenoides. **Ann N.Y. Acad. Sci** 669:7-20.

● Sorsa, M.K. y H. Vainio (1982) Biologic monitoring of exposure to chemical mutagens in the occupational environment. **Teratog Carcinog. Mutag.** 2:137-150

● Stavric, B (1994) Antimutagens and anticarcinogens in foods. **Food. Chem. Toxicol.** 32:79-90.

● Stock, J.A. (1970) Chemoterapy of cancer. **Chem Brit.** 6(1): 11-16.

● Szabad, J; I. Poos; G. Polgar y G. Hejja (1983) Testing the mutagenicity of malondialdehyde and formaldehyde by the *Drosophila* mosaic and the sex-linked recessive lethal tests. **Mutat. Res.** 113:117-133.

- Thomson W.A.R. (1980) *Las plantas medicinales*. Blume. México. 220 pp.

- Torres, M (1996) *Plantas medicinales de México Harla*, México 380 pp.

- Wallis, T.E. (1966) *Manual de farmacognosia* CECSA. México pp 477-481.

- Waters, M.D; A.L. Brady; H.F. Stack y H.E. Brockman (1990) Antimutagenicity profiles for some model compounds. *Mutat. Res.* 238:57-85.

- Wilkins, A.S. (1986) *Genetic analysis of animal development*. Wiley. Nueva York. 546 pp.

- Würglar, F. E. y E. W. Vogel (1986) *In vivo* mutagenicity testing using somatic cells of *Drosophila melanogaster*. En: *Chemical mutagens principles and methods for their detection*. (De serres, F.J. Eds). Plenum Press. Nueva York Vol. 10. pp 1-71.

- Verschoyle, R.D; R.M. Philpot; C.R. Wolf y D. Dinsdale (1993) CYP4B1 activates 4-ipomeanol in rat lung. *Toxicol. Appli Pharmacol.* 123(2):193-198.

- Vogel, E.W. y A.T. Natarajan (1979 a) The relation between reaction kinetics and mutagenic action of mono-functional alkylating agents in higher eukaryotic systems. I: Recessive letal mutations in *Drosophila*. *Mutat. Res.* 62:51-100.

- Vogel, E.W. y A.T. Natarajan (1979 b) The relation between reaction Kinetics and mutagenic action of mono-functional

alkylating agents in higher eukaryotic systems. II: Total and partial sex chromosome loss in *Drosophila*. *Mutat. Res.* 62:101-123.

● Vogel, E.W. y A. Szakmary (1990) **Basic principles and evaluation of results of assays measuring genotoxic damage in cell of *Drosophila***. The Netherlands. Mutation and the Environmental. pp 149-158.

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

● Vogel, E.W. y J. A. Zijlstra (1987) Mechanistic and metodological aspects of chemically induced somatic mutation and recombination in *Drosophila melanogaster*. *Mutat. Res.* 182:243-264.

● Vogel, E.W. (1992) **Genotoxic chemicals an introduction into the basic principles of genetic toxicology**. Laboratorium voor Stralengenetica en Chemische Mutagenese. RU Leiden, Sylvius Laboratoria. (Curso).

● Vogel, E.W. y A.T. Natarajan (1995) DNA damage and repair in somatic and germ cell *in vivo*. *Mutat. Res.* 330(1-2):183-208.

● Zijlstra, J.A. (1987) **Pharmacological and mechanistic aspects of chemically induced mutagenesis in *Drosophila melanogaster***. Tesis Doctoral. Drup: Krips Repro Meppel. 192 pp.