

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES

LICENCIATURA EN BIOLOGÍA



**EVALUACIÓN DE LA POSIBLE ACTIVIDAD GENOTÓXICA
DE ALFA-ASARONA EN CÉLULAS GAMÉTICAS Y
SOMÁTICAS DE VEGETALES**

TESIS

**QUE COMO PARTE DE LOS REQUISITOS
PARA OBTENER EL GRADO DE**

LICENCIADA EN BIOLOGÍA

PRESENTA

GUADALUPE MARÍA JUÁREZ FLORES

DIRIGIDA POR

M. EN C. LOURDES ELVIA RUÍZ FLORES

CENTRO UNIVERSITARIO

SANTIAGO DE QUERÉTARO, QUERÉTARO, MÉXICO

No Adq. H.59850
No. Título _____
Clas. 581.634
J91e

AGRADECIMIENTO

A todos aquellos maestros que
de una u otra forma me guiaron
para realizar este trabajo de investigación.

RESUMEN

Este trabajo fue parte del proyecto: "Síntesis, Farmacología y Toxicología de Agentes Hipolipidémicos Potenciales Análogos de alfa-asarona", clave 411300-54949 del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), México.

La alfa-asarona, es el principio activo mayoritario del extracto obtenido de la corteza de la planta *Guatteria gaumeri* Greenman, denominada yumel, utilizada en medicina tradicional para el tratamiento de la hipercolesterolemia y la colelitiasis. Este compuesto ha sido aislado y posteriormente sintetizado presentando las mismas propiedades terapéuticas que el extracto, por lo que de comprobar que no tiene efectos tóxicos se podrá obtener un fármaco eficiente.

Existen numerosas pruebas para evaluar la capacidad genotóxica de los agentes químicos, es decir, para conocer su efecto sobre el material génico; tales pruebas permiten determinar distintos tipos de alteraciones genéticas, tanto en células somáticas como gaméticas.

En esta investigación se utilizó el sistema de micronúcleos en células meióticas de *Tradescantia* clon 4430 y en células meristemáticas de *Allium cepa*, sistemas que son altamente eficientes, sensibles y útiles para evaluar genotoxicidad. Se estudiaron siete concentraciones: 30, 60, 90, 150, 180, 210 y 250 $\mu\text{g/ml}$ para cada uno de los sistemas, por triplicado; se utilizó etanol al 1% como disolvente. Para *Tradescantia* se obtuvo un efecto genotóxico ($p < 0.05$) a las concentraciones de 180, 210 y 250 $\mu\text{g/ml}$. Con el sistema de *Allium cepa* los resultados muestran un efecto genotóxico a la concentración de 210 $\mu\text{g/ml}$, sin alteraciones en su índice mitótico (9.0%), mientras que a 250 $\mu\text{g/ml}$ se observa un efecto tóxico ($p < 0.05$) con inhibición de la división mitótica (0.12%). Es conveniente restringir el uso de *Guatteria gaumeri* en tanto no se cuenten con otros datos de evaluación.

TABLA DE CONTENIDO

CAPÍTULO	Página
I. INTRODUCCIÓN Y JUSTIFICACIÓN.....	1
<i>Guatteria gaumeri</i>	1
ACCION FARMACOLÓGICA DEL EXTRACTO DE YUMEL.....	2
Hipercolesterolemia.....	2
Colelitiasis.....	3
Formación De Cálculos Biliares.....	3
AISLAMIENTO Y SÍNTESIS DE LA ALFA – ASARONA.....	6
ESTUDIOS FARMACOLÓGICOS CON EXTRACTO DE YUMEL..	7
ESTUDIOS FARMACOLÓGICOS CON ALFA – ASARONA.....	12
ESTUDIOS TOXICOLÓGICOS.....	13
TOXICIDAD AGUDA Y PROLONGADA.....	13
Estudios Teratogénicos.....	15
Estudios Genotóxicos.....	16
GENOTOXICIDAD.....	17
DAÑOS GENÉTICOS.....	17
Mutaciones en genes.....	17
BIOENSAYOS PARA EVALUAR GENOTOXICIDAD.....	19
PRUEBAS EN PLANTAS.....	20
Orígen De Los Micronúcleos.....	22
SISTEMA DE MICRONÚCLEOS EN CÉLULAS	
MITÓTICAS DE <i>Allium cepa</i>.....	26
VENTAJAS DEL SISTEMA.....	26
CICLO CELULAR DE <i>Allium cepa</i>.....	26
ESTUDIOS REALIZADOS CON EL SISTEMA <i>Allium cepa</i>.....	26
SISTEMA DE MICRONÚCLEOS EN CÉLULAS MEIÓTICAS DE	
<i>Tradescantia</i> CLON 4430.....	27

PROPAGACIÓN Y CUIDADOS DE <i>Tradescantia</i> CLON 4430.....	27
VENTAJAS DEL SISTEMA.....	28
MEIOSIS DE <i>Tradescantia</i> CLON 4430.....	28
ESTUDIOS REALIZADOS CON EL SISTEMA <i>Tradescantia</i> CLON 4430.....	29
II. OBJETIVOS.....	30
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	31
SOLUBILIDAD DE ALFA – ASARONA.....	31
DISEÑO EXPERIMENTAL.....	31
SISTEMA DE MICRÓNÚCLEOS EN CÉLULAS MERISTEMÁTICAS DE <i>Allium cepa</i>	32
OBTENCIÓN DE RAÍCES.....	32
TRATAMIENTO Y OBTENCIÓN DE PREPARACIONES.....	32
OBSERVACIÓN Y REGISTRO DE CÉLULAS.....	33
SISTEMA DE MICRÓNÚCLEOS EN CÉLULAS MEIÓTICAS DE <i>Tradescantia</i> CLON 4430.....	34
CULTIVO DEL MATERIAL BIOLÓGICO.....	34
TRATAMIENTO Y OBTENCIÓN DE PREPARACIONES.....	34
OBSERVACIÓN Y REGISTRO DE TÉTRADAS.....	36
ANÁLISIS ESTADÍSTICO PARA BIOENSAYOS VEGETALES.....	36
IV. RESULTADOS	37
V. DISCUSIÓN.....	52
VI. CONCLUSIONES.....	56
VII. LITERATURA CITADA.....	57

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. Formación De Cálculos Biliares	5
FIGURA 2. Química De Alfa-asarona y Su Forma Isomérica Beta-asarona.....	6
FIGURA 3. Etapas De La División Celular O Mitosis. Ciclo Celular, Mitosis Y Meiosis.....	24
FIGURA 4. Diagrama Del Proceso De La Meiosis. Sólo Se Muestra Un Par de Cromosomas.....	25
FIGURA 5. Duración Y Morfología General De Cada Una De Las Etapas De La Meiosis De <i>Tradescantia</i> Clon 4430.....	28
FIGURA 6. Sistema De Micronúcleos Inducidos Por Etanol En Células Mitóticas De <i>Allium cepa</i> Por Medio De La Prueba De Tukey.....	39
FIGURA 7. Sistema De Micronúcleos Inducidos Por Etanol En Células Meióticas De <i>Tradescantia</i> Clon 4430 Por Medio De La Prueba De Tukey.....	43
FIGURA 8. Sistema De Micronúcleos Inducidos Por Alfa - asarona En Células Mitóticas De <i>Allium cepa</i> Por Medio De La Prueba De Tukey.....	46
FIGURA 9. Sistema De Micronúcleos Inducidos Por Alfa - asarona En Células Meióticas De <i>Tradescantia</i> Clon 4430 Por Medio De La Prueba De Tukey.....	51

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA I.	Efecto De <i>Guatteria guameri</i> Sobre El Colesterol Sérico Del Perro.....	8
TABLA II.	Niveles Séricos De Colesterol Y Triglicéridos En Un Sujeto Bajo Tratamiento Con <i>Guatteria guameri</i>	9
TABLA III.	Efectos De La <i>Guateria guameri</i> Sobre Los Triglicéridos Séricos Del Perro.....	11
TABLA IV.	Efecto De <i>Guateria guameri</i> Sobre La Glucosa Sérica Del Perro.....	12
TABLA V.	Efecto Teratogénico De Alfa-asarona En Ratón.....	15
TABLA VI	Frecuencia De Intercambio De Cromátides Hermanas (ICH) Producidas <i>In Vitro</i> Por Alfa – asarona En Linfocitos Humanos.....	16
TABLA VII	Sistema De Micronúcleos En Células Mitóticas De <i>Allium cepa</i> Inducidas Por Etanol.....	38
TABLA VIII.	Porcentaje Del Índice Mitótico En Células Mitóticas De Raíces De <i>Allium cepa</i> Inducidas Con Etanol.....	40
TABLA IX.	Sistema De Micronúcleos En Células Meióticas De <i>Tradescantia</i> Clon 4430 Inducidas Con Etanol	42
TABLA X.	Sistema De Micronúcleos En Células Mitóticas De <i>Allium cepa</i> Inducidas Con Alfa-asarona.....	45
TABLA XI.	Porcentaje De Índice Mitótico En Células Mitóticas De Raíces De <i>Allium Cepa</i> Inducidas Con Alfa-asarona.....	48
TABLA XII	Sistema De Micronúcleos En Células Meióticas De <i>Tradescantia</i> Clon 4430 Inducidas Por Alfa-asarona.....	50

I. INTRODUCCIÓN Y JUSTIFICACIÓN

En la exégesis de este capítulo, dada la naturaleza del tema, advertimos que sus antecedentes debían ir inherentes al mismo para su mejor comprensión.

El uso de las plantas con fines curativos se remonta al principio de la historia de la humanidad. El hombre recurría a la naturaleza en busca de su alimento y de su salud. Por medio de aciertos y errores aprendió a conocer las plantas que lo curaban; conocimiento que se transmitió de generación a generación y fue incrementándose con la experiencia (Hernández-Magaña y Gally-Jorda, 1991).

Las culturas indígenas de México desarrollaron un gran conocimiento de la botánica utilizando su propio método de investigación y de colecta para propagar esta información, misma que llegó hasta los científicos del Viejo Mundo ayudándolos a realizar estudios más profundos sobre los recursos vegetales (Serrano-Cárdenas, 1991).

Guatteria gaumeri

Guatteria gaumeri Greenman, es un árbol del sureste de la República Mexicana, con una altura de 10 a 15 mts, conocido en lengua maya con los nombres de elemuy o ek-le-muy, de donde proviene el anagrama yumel (Martínez, 1992).

Pertenece a la familia de las anonáceas, su corteza es negra con hojas verdes oscuras, oval lanceoladas, acuminadas, enteras y glabras de 9 a 11 cm de largo; con un peciolo de 8 mm; posee flores solitarias blancas aproximadamente de 4 cm; su fruto es redondo, con un diámetro aproximado de 2 cm con los frutos estipitados (Martínez, 1992).

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

ACCIÓN FARMACOLÓGICA DEL EXTRACTO DE YUMEL

El extracto de la corteza del árbol yumel se emplea en medicina tradicional, entre otros propósitos, para el tratamiento de la hipercolesterolemia y la colelitiasis (Martínez, 1992).

Hipercolesterolemia

La síntesis del colesterol es un proceso complejo y energéticamente caro, por lo que es claramente ventajoso para un organismo poder regular la síntesis del colesterol. En los mamíferos la producción de colesterol está regulada por su concentración intracelular y por las hormonas insulina y glucagon. La concentración intracelular elevada de colesterol reduce la producción del receptor de las lipoproteínas de baja densidad (LDL), con lo que se hace más lenta la captación de colesterol sanguíneo.

Cuando la producción no regulada de colesterol sintetizado y el obtenido en la dieta supera la cantidad requerida para la síntesis de membranas, sales biliares y esteroides, se desarrollan en el hombre acumulaciones de esta sustancia en los vasos sanguíneos (placas ateroscleróticas), dando como resultado la obstrucción de vasos sanguíneos (aterosclerosis). El fallo cardíaco por oclusión de las arterias coronarias es una causa importante de muerte en las sociedades industrializadas. La aterosclerosis está ligada a niveles de colesterol en sangre y, especialmente, a niveles ligados a la LDL (Lehninger et al. 1995).

En la enfermedad genética humana denominada hipercolesterolemia familiar, los niveles sanguíneos de colesterol son extremadamente elevados, con lo que los individuos afectados desarrollan aterosclerosis severa desde la niñez. El receptor de LDL es defectuoso en estos individuos, por lo que no se produce la captación de colesterol transportado por LDL y mediada por receptor. En consecuencia, el colesterol obtenido de la dieta se acumula, contribuyendo a la formación de placas ateroscleróticas. La síntesis de colesterol endógeno continúa incluso en presencia de exceso de colesterol en la sangre porque el colesterol extracelular no puede entrar en el citosol para regular la síntesis intracelular (Lehninger et al. 1995).

Colelitiasis

Formación De Cálculos Biliares. Las sales biliares se forman en las células hepáticas a partir del colesterol, y en el proceso de su secreción sales biliares se elimina aproximadamente la décima parte de colesterol hacia la bilis. No se sabe si el colesterol tiene alguna función específica en la bilis; se cree que constituye simplemente un producto secundario de la formación y secreción de sales biliares.

El colesterol es casi insoluble en agua pura, pero las sales biliares y la lecitina de la bilis se combinan físicamente con éste para formar micelas ultramicroscópicas que sí son solubles. Cuando la bilis se concentra en la vesícula, las sales biliares y la lecitina se concentran junto con el colesterol, y lo mantienen en solución. Asimismo, la hormona secretina, que se vierte en la sangre desde la mucosa duodenal en respuesta al ácido del quimo, estimula la secreción por los conductos biliares de unos 200 ml diarios de líquido intensamente alcalino. Esta alcalinidad es esencial para la formación de micelas, ya que no se desarrollan en un medio ácido.

No obstante en condiciones anormales el colesterol puede precipitarse originando cálculos biliares según se indica en la Figura 1. Los factores que pueden causar precipitación del colesterol son los siguientes; 1) exceso de absorción de agua de la bilis; 2) exceso de absorción de sales biliares, ácidos grasos y lecitina de la bilis; 3) secreción excesiva de colesterol hacia la bilis; y 4) inflamación del epitelio de la vesícula biliar. Estos dos últimos hechos merecen consideración especial.

La cantidad de colesterol de la bilis depende principalmente de la cantidad de grasa que el individuo ha ingerido, pues las células hepáticas lo sintetizan en proporción aproximada a la cantidad de grasa metabolizada en el cuerpo. Por tal motivo, las personas que toman una dieta rica en grasa durante muchos años tienen gran tendencia a sufrir cálculos biliares.

La inflamación del epitelio de la vesícula biliar muchas veces resulta de una infección crónica ligera; ello modifica las características de absorción excesiva de agua a sales biliares u otras sustancias necesarias para mantener el colesterol en solución. En consecuencia, éste comienza a precipitar, generalmente formando muchos pequeños cristales de colesterol en la superficie de la mucosa inflamada. Estos cristales, a su vez, actúan como nidos para precipitación ulterior de colesterol, y van haciéndose cada vez más voluminosos. A veces se producen gran número de cálculos como granos de arena, pero es más frecuente que se reúnan para formar unos pocos cálculos biliares voluminosos; un solo cálculo llena la vesícula biliar (Guyton, 1992).

CAUSAS DE CÁLCULOS BILIARES

1. Absorción de agua de la bilis.
2. Absorción excesiva de ácidos biliares de la bilis.
3. Exceso de colesterol en la bilis.
4. Inflamación del epitelio.

HÍGADO

Cálculos

Conducto Hepático

CURSO SEGUIDO POR LA BILIS

1. Durante el reposo.
2. Durante la digestión

COLEDOCO

ESFÍNTER DE ODOCO

CONDUCTO PANCREÁTICO

VESÍCULA BILIAR

CÁLCULOS

CONDUCTO CÍSTICO

AMPOLLA DE VATER

DUODENO

FIGURA 1. Formación De Cálculos Biliares (Guyton, 1992).

AISLAMIENTO Y SÍNTESIS DE LA ALFA - ASARONA

La alfa - asarona (2, 4, 5 - trimetoxipropenilbenceno), demostró ser el principio activo mayoritario (Fig. 2), fue inicialmente obtenida del aceite de cáalamo Jammu juntamente con la forma isomérica denominada beta - asarona (Baxter et al. 1962).

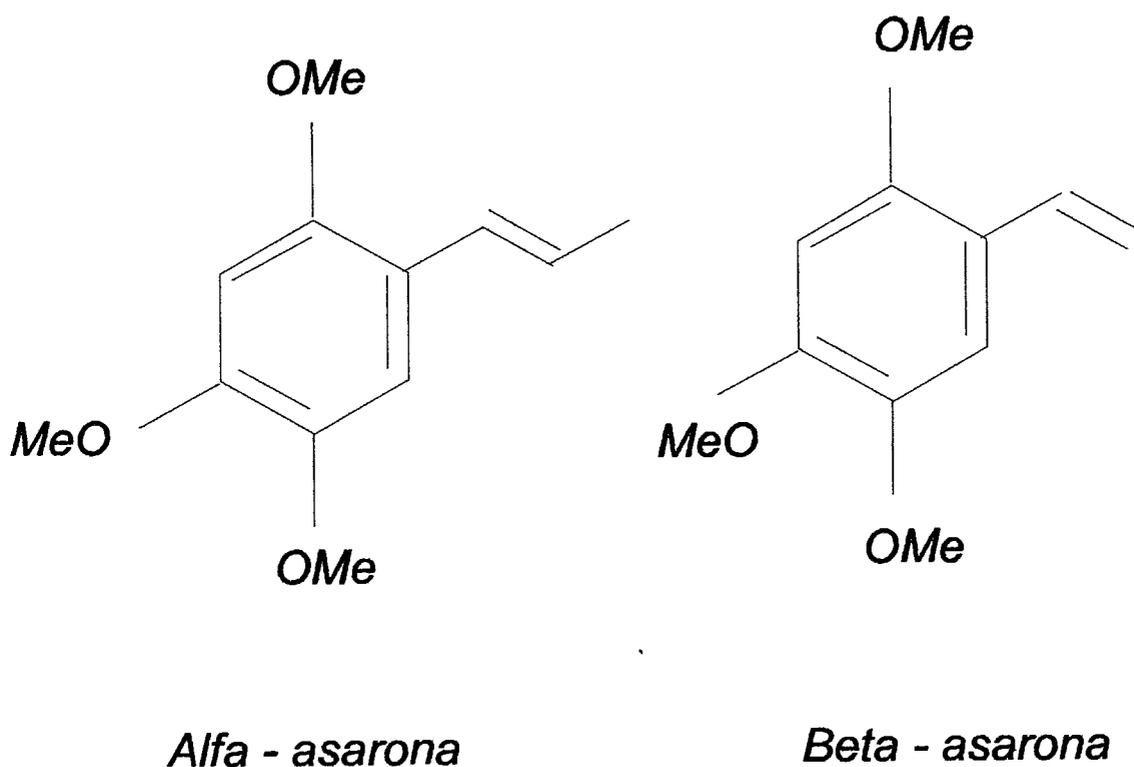


FIGURA 2. Estructura Química De Alfa - asarona y Su Forma Isomérica Beta - asarona (Baxter et al. 1962).

Posteriormente, Mandoki et al. 1980 aislaron la forma cristalina de a partir de la corteza de yumel mediante extracción con éter de petróleo y metanol. Jiménez et al. 1984, la extrajeron con hexano, que se fraccionó mediante una fase móvil de hexano – acetato de etilo de polaridad creciente y pasó por una columna de gel de sílice, lográndose así un rendimiento del 1.3%. Las determinaciones del punto de fusión y análisis por cromatografía de capa fina, espectroscopía de luz infrarroja y resonancia nuclear, demostraron su identidad comparado con alfa – asarona estándar.

Los primeros intentos de síntesis de alfa – asarona fueron realizados en 1899 por Gatterman citado por Díaz et al. 1990 y posteriormente por Seshadri y Thiruvengadam (1950). Después se obtuvo por diversos métodos habiendo dado cada uno de ellos rendimientos diferentes (Sánchez – Viesca, 1966). Sin embargo, sólo algunos condujeron a un producto isoméricamente puro.

Recientemente Díaz et al. 1990 optimizaron la síntesis con una recuperación de 90 – 95% y sintetizaron además compuestos estructuralmente relacionados con la alfa – asarona, como derivados del 4 – propenil – 1, 2 – dimetoxibencenos 5 sustituidos con grupos MeO-, NO, NH, CL-, Y e H-, cuyo cernimiento farmacológico mostró que algunos de ellos están provistos también de actividad hipolipodémica importante (Díaz et al. 1993).

ESTUDIOS FARMACOLÓGICOS CON EXTRACTOS DE YUMEL

Sánchez-Reséndiz et al. 1980 estudiaron la actividad hipercolesterolemizante de yumel en 28 perros, divididos en tres grupos: el testigo recibió placebo y los restantes, 0.0125 y 0.025 ml/kg y por día de un extracto hidroalcohólico de *Guatteria guameri*. La dosis diaria se dividió en dos tomas que se administraron a las 8 y 20 horas, durante 30 días. Se determinó colesterol sérico antes y después del tratamiento por el procedimiento de Pearson et al. 1953. En el grupo que recibió la fármaco a la dosis alta (0.025 ml/kg/día) se observó una diferencia

estadísticamente significativa con $p < 0.05$. Aunque los autores no escogieron grupos homogéneos para registrar el verdadero efecto a la dosis de 0.0125 ml/kg/día, el descenso que se observó en el colesterol sérico de los perros que recibieron *Guatteria guameri* a la dosis alta no parece deberse a factores alimenticios o a variaciones estacionales. Este efecto pudiera entonces atribuirse a la acción del fármaco y representa una buena respuesta terapéutica, pues el descenso a los niveles de colesterol fue del 16.52% y el criterio más comúnmente aceptado sobre la eficiencia de los fármacos hipercolesterolemiantes exige una disminución del 15% en relación a los niveles iniciales (Díaz del Castillo et al. 1977) (Tabla I).

TABLA I. Efecto De *Guatteria guameri* Sobre El Colesterol Sérico Del Perro.

	(mg/100 ml)			
	NÚMERO DE CASOS	ANTES DEL TRATAMIENTO ($\bar{x} \pm s$)	DESPUÉS DEL TRATAMIENTO ($\bar{x} \pm s$)	VALOR DE "p"
Placebo	9	223 \pm 28	216 \pm 30	>0.3
<i>Guatteria guameri</i> 0.0125 ml /kg/día	10	191 \pm 25	182 \pm 24	>0.2
<i>Guatteria guameri</i> 0.025 ml /kg/día	9	224 \pm 35	187 \pm 35	<0.05

(Díaz del Castillo et al. 1977).

La búsqueda de nuevos fármacos hipercolesterolemiantes es particularmente importante debido a la estrecha relación que existe entre la hipercolesterolemia y la aterosclerosis y especialmente porque la mayoría de los medicamentos que se emplean actualmente con este fin producían diversos efectos tóxicos en ocasiones severos.

En otro estudio Sánchez-Reséndiz y Lerdo de Tejada (1980) decidieron administrar tintura de *Guatteria guameri* a un sujeto con elevación combinada de

colesterol y triglicéridos que había recibido tratamiento hipercolesterolemiantes con otro fármaco sin mucho éxito. Se instauró dieta hipercolesterolemiantes y se administró clofibrato durante 15 meses. En diciembre de 1976 el colesterol y los triglicéridos habían bajado a 264 y 193 mg/100ml, respectivamente, como puede verse en la Tabla II. A partir de entonces no presentó cambios apreciables en la lipemia hasta enero de 1977 en que suspendió el tratamiento con la elevación consiguiente de los lípidos séricos. En ese mismo mes se le suministró la dieta hipercolesterolemiantes y se inició el tratamiento con *Guatteria gaumeri* (10 gotas de tintura, 3 veces al día). Llama la atención que en este caso se consiguió con el tratamiento de *Guatteria gaumeri* un descenso de 27.7% del colesterol y del 32% de los triglicéridos que no se había logrado con el clofibrato empleado anteriormente. Además desaparecieron los xantomas eruptivos que habían estado presentes cerca de 20 años.

TABLA II. Niveles Séricos De Colesterol Y Triglicéridos En Un Sujeto Bajo Tratamiento Con *Guatteria gaumeri*.

(mg/100ml)			
FECHA	TRATAMIENTO	COLESTEROL (mg/dl)	TRIGLICÉRIDOS (mg/dl)
Septiembre 1975	Ninguno	310	248
Diciembre 1976	Clofibrato	264	193
Enero 1977	Ninguno	291	220
Marzo 1977	<i>Guatteria gaumeri</i>	295	150
Mayo 1977	<i>Guatteria gaumeri</i>	247	204
Febrero 1978	<i>Guatteria gaumeri</i>	240	131
Septiembre 1979	<i>Guatteria gaumeri</i>	212	148

(Sánchez-Reséndiz y Lerdo de Tejada 1980).

Durante la administración de la tintura de *Guatteria gaumeri* a un paciente con hiperlipidemia tipo IIb de Fredrickson (Fredrickson, 1971) que presentaba xantomas eruptivos muy abundantes (Sánchez-Reséndiz y Lerdo de Tejada, 1980), se observó la desaparición de estas lesiones que se han atribuido

tradicionalmente al aumento de los triglicéridos circulantes (Hernández y Zorrilla, 1969; Parker et al. 1970). Como complemento de estos estudios, Lerdo de Tejada et al. 1980 estudiaron en condiciones experimentales controladas el efecto del extracto antes mencionado sobre los niveles séricos de triglicéridos en perros.

Se estudiaron 28 perros divididos en tres grupos: el testigo que recibió placebo y los otros dos, respectivamente 0.0125 y 0.025 ml/kg por día, del extracto hidroalcohólico. La dosis diaria se dividió en dos tomas que se administraron a las 8 y 20 horas, durante 30 días. Se determinaron triglicéridos en suero antes y después del tratamiento. En el grupo que recibió el extracto a la dosis alta (0.025 ml/kg/día) se observó a nivel de triglicéridos circulantes (Tabla III), una diferencia estadísticamente significativa con $p < 0.05$. Este efecto observado en el grupo de perros que recibieron la tintura a la dosis alta (0.025 ml/kg/día) parece deberse a la acción del medicamento y no a otro tipo de factores, puesto que no se presentó en los grupos que recibieron placebo o tratados con *Guatteria gaumeri* a dosis baja. El descenso encontrado corresponde al 25.45% de los valores iniciales, por lo que puede considerarse una respuesta terapéutica muy satisfactoria.

Uno de los mecanismos más comunes para hacer descender los triglicéridos plásmicos, es la reducción del aporte de carbohidratos al hígado (Lees y Fredrickson, 1965). El estudio del efecto de *Guatteria gaumeri* sobre la glucemia del perro podría dar información interesante para entender el mecanismo hipotrigliceridemiante del fármaco.

TABLA III. Efectos De La *Guatteria gaumeri* Sobre Los Triglicéridos Séricos Del Perro.

(mg/100 ml)				
	NÚMERO DE CASOS	ANTES DEL TRATAMIENTO ($\bar{x} \pm s$)	DESPUÉS DEL TRATAMIENTO ($\bar{x} \pm s$)	VALOR DE "p"
Placebo	9	46 \pm 8	44 \pm 5	>0.25
<i>Guatteria gaumeri</i> 0.0125 ml /kg/día	10	53 \pm 11	57 \pm 16	>0.25
<i>Guatteria gaumeri</i> 0.025 ml /kg/día	9	55 \pm 16	41 \pm 11	<0.05

(Lees y Fredrickson 1965).

En otra investigación Lerdo de Tejada et al. 1980 estudiaron 29 perros divididos en tres grupos: el testigo que recibió placebo y dos que recibieron, respectivamente, 0.0125 y 0.025 ml/kg de peso corporal y por día, de un extracto hidroalcohólico de *Guatteria gaumeri*. La dosis diaria se dividió en dos tomas que se administraron a las 8 y 20 horas, durante 30 días.

Se determinó glucosa por el método de ortotoluidina de Cooper y Mc Daniel (1970). Con los datos obtenidos en el estudio sugirieron que la tintura de *Guatteria gaumeri* tiene acción hipoglucemiante. Este efecto es de consideración pues el descenso de la glucemia fue del 22.68% con la dosis baja del fármaco y del 27.78 % con la dosis alta.

La disminución en los valores de glucosa puede explicar, por lo menos en parte, la acción hipotrigliceridemiante del medicamento, ya que al bajar la glucemia decrece el aporte de glucosa al hígado, con lo cual disminuye la síntesis de triglicéridos (Lees y Fredrickson, 1965) (Tabla IV).

TABLA IV. Efecto De *Guatteria gaumeri* Sobre La Glucosa Sérica Del Perro.

	(mg/100 ml)			
	NÚMERO DE CASOS	ANTES DEL TRATAMIENTO ($\bar{x} \pm s$)	DESPUES DEL TRATAMIENTO ($\bar{x} \pm s$)	VALOR DE "p"
Placebo	10	82 \pm 7	76 \pm 22	>0.25
<i>Guatteria gaumeri</i> 0.0125 ml /kg/día	10	97 \pm 11	75 \pm 12	>0.0005
<i>Guatteria gaumeri</i> 0.025 ml /kg/día	9	90 \pm 7	65 \pm 6	<0.0005

(Lees y Fredrickson, 1965).

Sánchez-Reséndiz et al. 1985 investigaron el efecto hidroalcohólico de *Guatteria gaumeri* sobre el colesterol de las diferentes lipoproteínas (LP) séricas del conejo. Se estudiaron 33 animales divididos en tres grupos el testigo y otros dos que recibieron el fármaco a las dosis de 25 y 500 μ l/kg/dl. Con estas dosis se observaron disminuciones de distinta cuantía en el colesterol de las diferentes fracciones estudiadas. Se encontró la disminución de 23% y 37% en el colesterol total ($p < 0.05$ y < 0.01) de 27% y 39% en el de las LP de baja densidad ($p < 0.05$ y < 0.01) y de 11% y 29% en las LP de alta densidad ($p > 0.1$ y < 0.01). La relación entre colesterol total y colesterol de LP de alta densidad disminuyó de 3.8 a 3.3 y 3.7 respectivamente.

ESTUDIOS FARMACOLÓGICOS CON ALFA – ASARONA

Gómez et al. 1987 estudiaron el efecto hipocolesterolemia de la alfa – asarona en ratas observando que con 25 mg/kg, disminuía 56.3% los niveles de colesterol, tanto en ratas alimentadas con un régimen hiperlipidémico como en aquéllas a las que se les administró propiltiouracilo. Las concentraciones de triglicéridos también disminuyeron significativamente (61.3%). Recientemente,

Garduño et al. 1997 encontraron que en ratón, dosis de 80 ml/kg provocaron un descenso del colesterol hasta del 49.6%; del LDL- colesterol, de 65.9% y de triglicéridos, del 83.7%.

En lo que concierne al mecanismo de acción hipocolesterolemiante de la alfa – asarona, los datos obtenidos a la fecha en cultivo de hepatocitos en ratas, indican que el efecto lipídico puede deberse a una inhibición de la secreción de lípidos y probablemente a la de su síntesis. Los triglicéridos fueron los más afectados (hasta 97% de inhibición) pero también disminuyeron considerablemente los fosfolípidos (87%), el colesterol (70%) y los ésteres de colesterol (92%) (Hernández et al. 1993).

Por lo tanto, a través de esos estudios farmacológicos se detectaron idénticas propiedades terapéuticas del compuesto alfa – asarona y del extracto de yumel, dando paso a investigaciones de su posible inocuidad.

ESTUDIOS TOXICOLÓGICOS

TOXICIDAD AGUDA Y PROLONGADA

La toxicidad aguda de la alfa – asarona ha sido determinada por algunos autores. En ratas, Sharma y Dandiiya (1962) encontraron una dosis letal (DL₅₀) de 300 mg/kg por administración intraperitoneal; en cobayo fue de 275 mg/kg, por la misma vía (National Institute for Occupational Safety and Health USA, 1977).

En ratones, Yuco – Yabiku (1980) encontró una dosis de 225 mg/kg y Morales – Ramírez et al. (1992), de 245 mg/kg en esta misma especie.

La beta – asarona presentó valores de DL₅₀ menores tanto en ratas (122 mg/kg) como en ratones (184 mg/kg) según comunicaron Sharma y Dandiya (1962) y Yuco – Yabiku (1980) respectivamente, lo cual sugiere que es más tóxica que la forma alfa.

Mandoki et al. 1980 informaron que la alfa asarona administrada a ratas durante cuatro semanas a dosis de 55 y 80 mg/kg, produjeron eliminación de la bromosulfaleína semejante a la del grupo testigo. Asimismo, en ratas macho y hembra, las dosis de 10 y 50 mg/kg, administradas durante el mismo tiempo, no dieron lugar a modificación en las concentraciones de fosfatasa alcalina, deshidrogenasa láctica, bilirrubina y transaminasas. Tampoco hubo cambios en la composición de la orina, peso de órganos y arquitectura hepática (Garduño et al. 1992).

En estudios realizados en hepatocitos de rata adulta cultivados sobre una monocapa de fibroblastos, se encontró que la exposición a alfa - asarona (1 – 50 µg /ml), durante una y dos semanas, produjo aumento en el número y tamaño de gotas intracitoplasmáticas de lípidos (esteatosis) y a las concentraciones más elevadas (25-50 µg/ml), retracción de los cordones de hepatocitos y desprendimiento de las células de las cajas de cultivo (muerte celular).

Ultraestructuralmente, en hepatocitos tratados con 10 µg/ml se encontraron mitocondrias gigantes con vacuolizaciones, además de las gotas intracitoplasmáticas de lípidos. El contenido intracelular de triglicéridos incrementó hasta 2.3 veces, mientras que el contenido de proteína por caja de cultivo, que es un indicador del número de células y por tanto de la viabilidad celular, disminuyó hasta en 53%.

La secreción de proteínas descendió hasta en 67% y la síntesis de proteínas celulares y totales hasta en 67% (López et al. 1992).

Estudios Teratogénicos

Jiménez et al. 1984 encontraron que la administración oral de la alfa-asarona a ratas, del 6 al 15 día de la gestación a dosis de 50 a 75 mg/kg, dio lugar a toxicidad materna reflejada en reducción del peso corporal. Aunque no se observaron malformaciones congénitas en la descendencia, si se produjeron efectos embriotóxicos con reducción de número y peso de camadas. En el ratón en cambio, utilizando el mismo período de administración, las dosis de 60 mg/kg indujeron teratogenia, además de toxicidad materna y embriotoxicidad, siendo las anomalías más frecuentes, hidrocefalia, costillas extras, paladar hendido y extremidades deformes (Salazar et al. 1992) (TablaV).

TABLA V. Efecto Teratogénico De Alfa – Asarona En Ratón.

Parámetros	Alfa asarona (mg/kg)				
	TESTIGO	5	15	30	60
Acopladas	22	21	23	23	23
Gestantes	20	20	21	21	22
Implementaciones	200	185	199	193	206
Promedio/madre \pm DE	10.0 \pm 5	9.2 \pm 1.6	9.5 \pm 2.3	9.2 \pm 2.1	9.3 \pm 2.4
Fetos	184	164	163	156	164
Promedio /madre \pm DE	9.2 \pm 1.6	8.2 \pm 2.4	7.8 \pm 2.2*	7.4 \pm 2.5*	7.4 \pm 2.4*
Afectados por reabsorciones o muertes	16	21	36**	37**	42**
Malformaciones	12	22	10	11	62
Peso promedio \pm DE	1.2 \pm 0.1	1.2 \pm 0.1	1.2 \pm 0.1	1.2 \pm 0.1	1.0 \pm 0.1

* Diferencia significativa con el grupo testigo ($p < 0.05$) con prueba t de Student.

** Diferencia significativa con el grupo testigo ($p < 0.05$) con prueba de chi cuadrada. (Salazar et al. 1992).

Estudios Genotóxicos

Mohar-Betancourt et al. 1986 observaron en ratas una respuesta mutagénica de *Salmonella typhimurium* cepa TA100, utilizando la prueba de Ames. A su vez, la orina de ratas contenía metabolitos mutagénicos para las cepas TA100 y VTH 8414. También Morales-Ramírez et al. 1992 encontraron un ligero pero significativo aumento de la frecuencia de intercambio de cromátides hermanas en linfocitos humanos *in vitro* así como en células *in vivo* de médula ósea de ratón (TablaVI). Sin embargo, en un estudio de dominantes letales en ratas, no hubo cambios en la frecuencia, indicados por la muerte pre y postimplantatoria (Chamorro et al. 1992).

TABLA VI. Frecuencia De Intercambio De Cromátides Hermanas (ICH) Producidas *In Vitro* Por Alfa – asarona En Linfocitos Humanos.

Dosis (µg/ml)	ICH/célula (media ±EEM)	Índice mitótico (%)	Índice de replicación
Testigo	8.0±0.4	1.8	1.68
Etanol 25%	7.5±0.7	2.0	1.58
30	9.6±0.5	1.4	1.47
60	10.9±0.4 *	1.4	1.41
90	10.5±0.4 *	1.3	1.51
120	11.4±0.4 *	1.2	1.41
150	11.7±0.4 *	1.2	1.40**
180	12.6±0.5 *	0.8	1.36**
210	12.2±0.6 *	0.8	1.35**

EEM= error estándar de la media; 30 células analizadas por dosis para ICH y 100 células por índice de replicación.

*Diferencia significativa con el grupo testigo ($p < 0.01$) con prueba t de Student.

**Diferencia significativa con el grupo testigo ($p < 0.01$) con prueba de chi-cuadrada. (Morales-Ramírez et al. 1992).

También se encontró efecto genotóxico en un estudio de dominantes letales efectuados en ratones machos con administración de alfa – asarona durante 5 días (Chamorro et al. 1998) y en ratas hembras y machos con administración similar (Chamorro et al. 1999a) encontrándose en los dos casos aumento en la muerte postimplantación. Este no fue el caso de otro experimento llevado a cabo en ratas macho y hembra después de tratamiento subcrónico (Chamorro et al. 1999b).

GENOTOXICIDAD

El término genotoxicidad, ha sido utilizado algunas veces como sinónimo de mutagenicidad, sin embargo, existen sustancias no mutagénicas que pueden causar metilaciones aberrantes en el ADN (Kolbye et al. 1983).

El daño producido por diversos factores al material genético, por medio de la mutagénesis, es uno de los riesgos toxicológicos que no se han valorado suficientemente, a pesar de su repercusión en la salud de los individuos afectados y sus descendientes (Trosko y Chang, 1978).

DAÑOS GENÉTICOS

Mutaciones en genes

Las mutaciones en genes son cambios en la secuencia del ADN de un gen; persisten en las poblaciones celulares. Si se separan segmentos del cromosoma durante la división nuclear, pueden volverse a unir de manera incorrecta en el cromosoma y originar una inversión. Pueden reunirse con una parte diferente del mismo cromosoma o con otro cromosoma y causan una traslocación. Si el segmento se pierde se denomina deficiencia o supresión que es casi siempre, fatal. Una parte de un cromosoma puede duplicarse y ocurrir dos veces en el

mismo cromosoma o en dos cromosomas diferentes no homólogos. Es lo que se conoce como duplicación. Las mutaciones cromosómicas ocurren naturalmente pero su frecuencia se aumenta por efectos de rayos X y mutágenos químicos. Además, las aberraciones estables, como los rompimientos de cromosomas, dan lugar a fragmentos acéntricos (ejemplo: rompimiento de piezas de cromosomas sin centrómero), cromosomas dicéntricos, cromosomas en anillos, y varios arreglos asimétricos nuevos que son inestables. Con ésto generalmente causan la muerte de las células por medio de la pérdida del material genético o por el impedimento mecánico de la mitosis (Bender et al. 1988).

El daño al material genético producido por los más diversos factores, a través de la mutagénesis, es uno de los riesgos toxicológicos que deben evaluarse suficientemente por sus descendientes. Para esto, el hombre sería el modelo biológico ideal, sin embargo, los problemas éticos y culturales dificultan la investigación en humanos y, aún cuando por la vía epidemiológica se obtiene información valiosa e insustituible sobre el efecto a la salud de la población, desgraciadamente se logra tardíamente, cuando ya ha sido afectado el patrimonio hereditario de la población. Es por esto, que los sistemas biológicos no humanos resultan valiosos para evaluar los efectos genéticos de agentes químicos, además por reproducibilidad, facilidad de realización, relativa economía y corta duración.

Debido a los diferentes resultados obtenidos con alfa-asarona y ante la posibilidad de que la lafa - asarona pudiera emplearse como principio activo de fármacos, el Laboratorio de Toxicología Preclínica de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas buscó incrementar la batería de pruebas para estudiar su inocuidad. Por esta razón el Centro de Estudios Académicos sobre Contaminación Ambiental (CEACA-Fac. Química) también colaboró como parte del grupo interdisciplinario en este proyecto, utilizando los sistemas de micronúcleos en células meióticas de *Tradescantia* clon 4430 y células mitóticas de *Allium cepa*.

BIOENSAYOS PARA EVALUAR GENOTOXICIDAD

Investigaciones referente al uso de sustancias que reducen niveles de colesterol en humanos son obviamente importantes. El compuesto alfa-asarona ha probado ser efectivo reduciéndolo significativamente.

En virtud de lo anterior, pareció interesante resalizar las pruebas de genotoxicidad, que tienen por objetivos demostrar cualitativamente la presencia o ausencia de capacidad mutagénica o carcinogénica de agentes químicos y físicos.

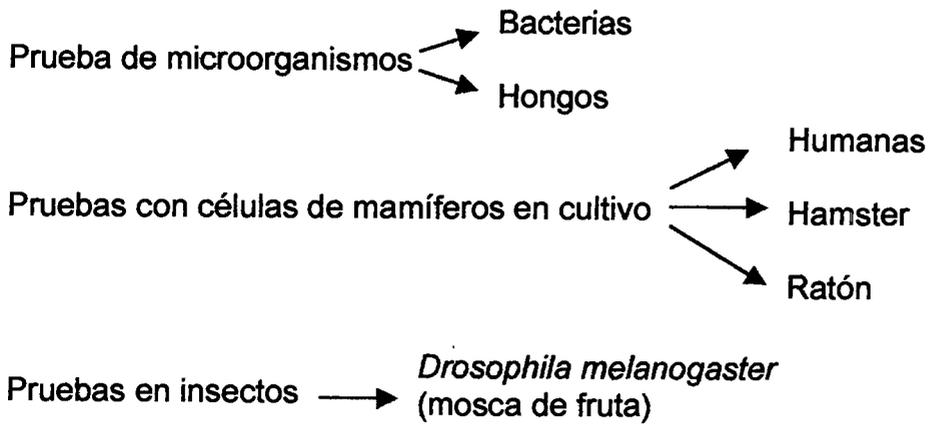
Debido al alto riesgo originado por una alteración al material genético, se han desarrollado diversas pruebas para medir este daño.

Existen dos tipos de pruebas de genotoxicidad. Las pruebas de larga duración que apuntan a evaluar la carcinogenicidad en períodos que van de meses a años y se efectúan fundamentalmente *in vivo*, en mamíferos. Las pruebas mutagénicas de corta duración son diseñadas para demostrar, en un término de horas o hasta meses, según la prueba, la capacidad mutagénica de una sustancia estudiada (Vega, 1985).

A continuación se muestran algunas características de pruebas a corto plazo que permiten detectar agentes de riesgo:

Prueba en ADN aislado

Prueba en virus



PRUEBAS EN PLANTAS

Los sistemas biológicos y las pruebas más utilizadas son:

Tradescantia : Micronúcleos en células meióticas;
Mutaciones en células somáticas en
pelos estaminales.

Allium cepa: Micronúcleos en células mitóticas.

Vicia faba: Micronúcleos en células mitóticas.

Las plantas superiores han sido organismos muy usados como sistemas de prueba para evaluar y seleccionar mutágenos. Han existido por muchos años, pero sólo hace 20 años han empezado a recibir el reconocimiento de ser sistemas garantizados por su sensibilidad (De Serres, 1978; Sandhu et al. 1981).

Estas son útiles como dosímetros biológicos en el estudio del efecto de contaminantes ambientales, plagicidas, fertilizantes, y productos químicos así como cualquier sustancia distribuida en forma natural en el medio ambiente, lo cual es difícil de hacer con otros sistemas de prueba (Cortinas de Nava et al. 1980).

Así también, existen agentes químicos considerados contaminantes que presentan determinados problemas para llevar a cabo las pruebas de mutagenicidad por medio de ensayos convencionales como los microbianos; estos problemas pueden ser superados por el uso de varios sistemas de plantas superiores en donde los daños genéticos se detectan con sensibilidad, ya que facilitan la evaluación de los mutágenos seleccionados; y por lo tanto son utilizadas más extensivamente como indicadores de actividad mutagénica.

Para el conocimiento de la actividad mutagénica de alguna sustancia química se deben incluir una serie de ensayos que sean capaces de detectar su potencial mutagénico, así como el de sus metabolitos; ya que el metabolismo de los mamíferos podría transformarlas de inócuas a potentes mutágenos y carcinógenos (De Serres, 1978).

Los sistemas de plantas superiores que tienen sitios específicos de prueba, presentan ventajas sobre otros sistemas ya que permiten apreciar en dichos sitios, la mutagenicidad de compuestos químicos sencillos o una combinación de ellos.

Dependiendo de las circunstancias, las plantas pueden ser tratadas con uno o más mutágenos.

Uno de los principales objetivos de observar los cromosomas en este tipo de sistemas de monitoreo es determinar si un químico es un clastógeno (capaz de

romper cromosomas); y de ser así, saber si provoca intercambios con consecuencias citológicas o daño genético.

Origen De Los Micronúcleos

Los micronúcleos son fragmentos que se encuentran separados del núcleo de las células en interfase; estos núcleos pequeños tienen una apariencia en el citoplasma que es similar a la calidad de tinción similar a la cromatina del núcleo (Lendenbor y Schimd, 1973).

La prueba de micronúcleos para el análisis del daño citogenético, está basada en la observación de rompimientos o intercambios cromatínicos originados por desórdenes en la distribución de la cromatina en la anafase y que en el curso de la telofase; una porción considerable de cada cromatina desplazada no es incluida en el núcleo de las células hijas, pero forma de micronúcleos simples o múltiples en el citoplasma de estas células.

Varios autores han investigado el proceso de formación de micronúcleos después de tratamientos con agentes tóxicos. Se ha descrito tres mecanismos que influyen en la formación de estos en las células interfásicas de *Allium cepa* y en general en otros sistemas:

a) Como resultado de los tratamientos se forman fragmentos acéntricos de cromosomas; estos no son transportados a los polos anafásicos, sino que persisten durante la telofase y no se incorporan al núcleo de las células hijas, y quedan como pequeños núcleos (Read, 1959; Kihlman, 1966; 1971).

b) Cuando son cromosomas completos con una alteración o inactivación del centrómero (Ramanna y Natarajan, 1966; Schmid, 1976).

c) Pueden también originarse por formación de isocromosomas debidos a rompimientos de la región centromérica en un plano perpendicular al normal, que además tienen problemas en su unión al huso.

La mayoría de los rompimientos de los cromosomas por agentes químicos tóxicos inicialmente causan un daño aislado del ADN, así la formación de micronúcleos requiere tanto de la misma síntesis como de la mitosis. Si el número de rompimientos ocurre durante el penúltimo ciclo celular, se producen lesiones simples aisladas potencialmente lábiles que causan formación de micronúcleos, son duplicables antes de terminar la mitosis (Nicoloff y Gecheff, 1976).

Los micronúcleos se han usado para medir el daño cromosómico causado por radiaciones en plantas causado por radiaciones (Ma et al. 1978); esta técnica también se ha aplicado en diversos tejidos y otros sistemas: *in vivo*, en médula ósea de ratón (Lendenbor y Schmid, 1973), cultivos celulares (Countryman y Heddle, 1976; Heddle et al. 1978), en *Tradescantia* (Ma, 1983; Ruíz-Flores et al. 1992 y *Vicia faba* (Degrassi y Rizonni, 1982), *Allium sativum* (Valadaud-Varrieu, 1983) y *Allium cepa* (Escalza et al. 1983; Valtierra y Ruíz-Flores, 1987; Hanzen y Gutiérrez-González, 1988).

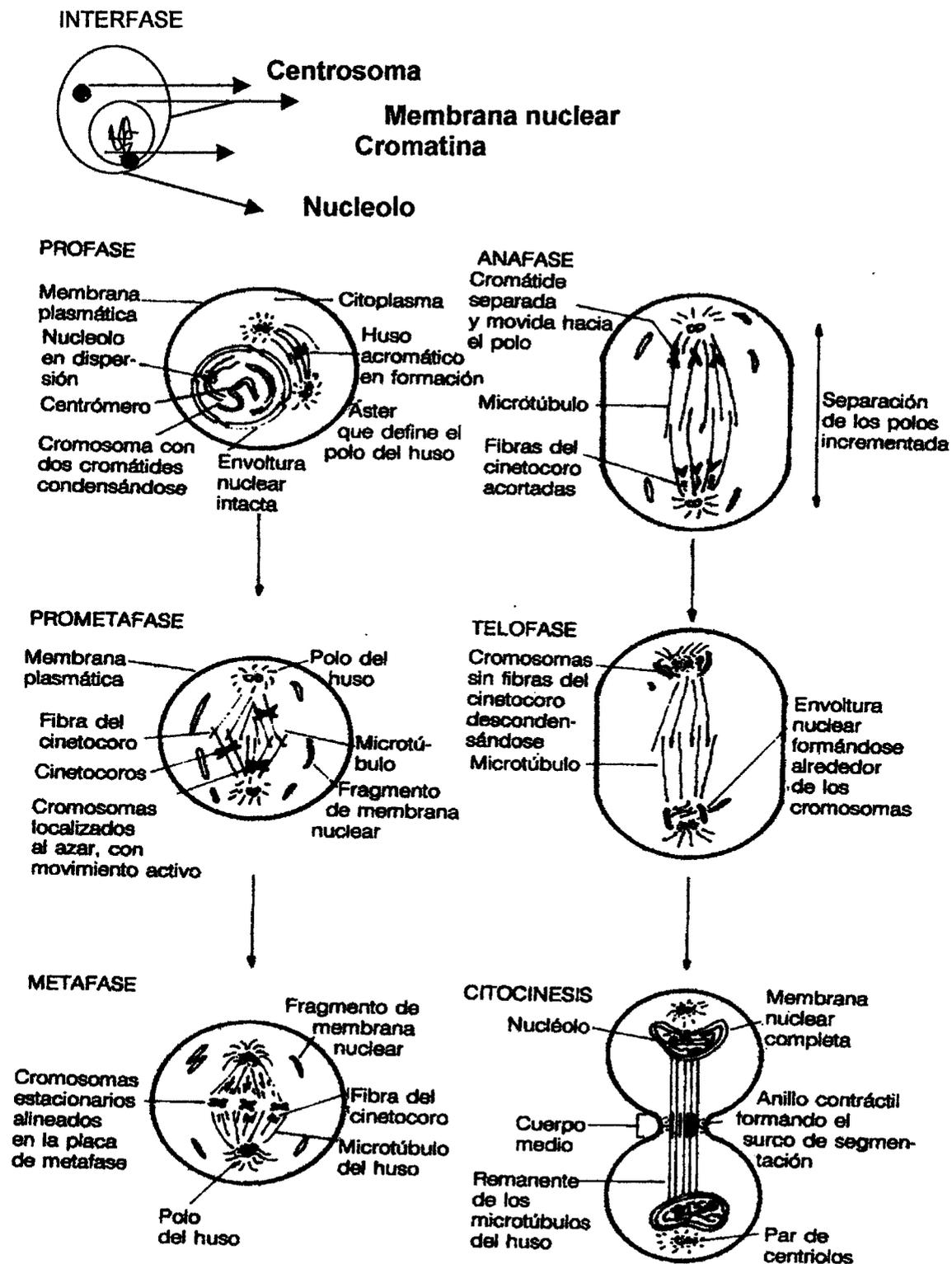


FIGURA 3. Etapas De La División Celular O Mitosis.
Ciclo Celular, Mitosis Y Meiosis (García-Nieto et al. 1986).

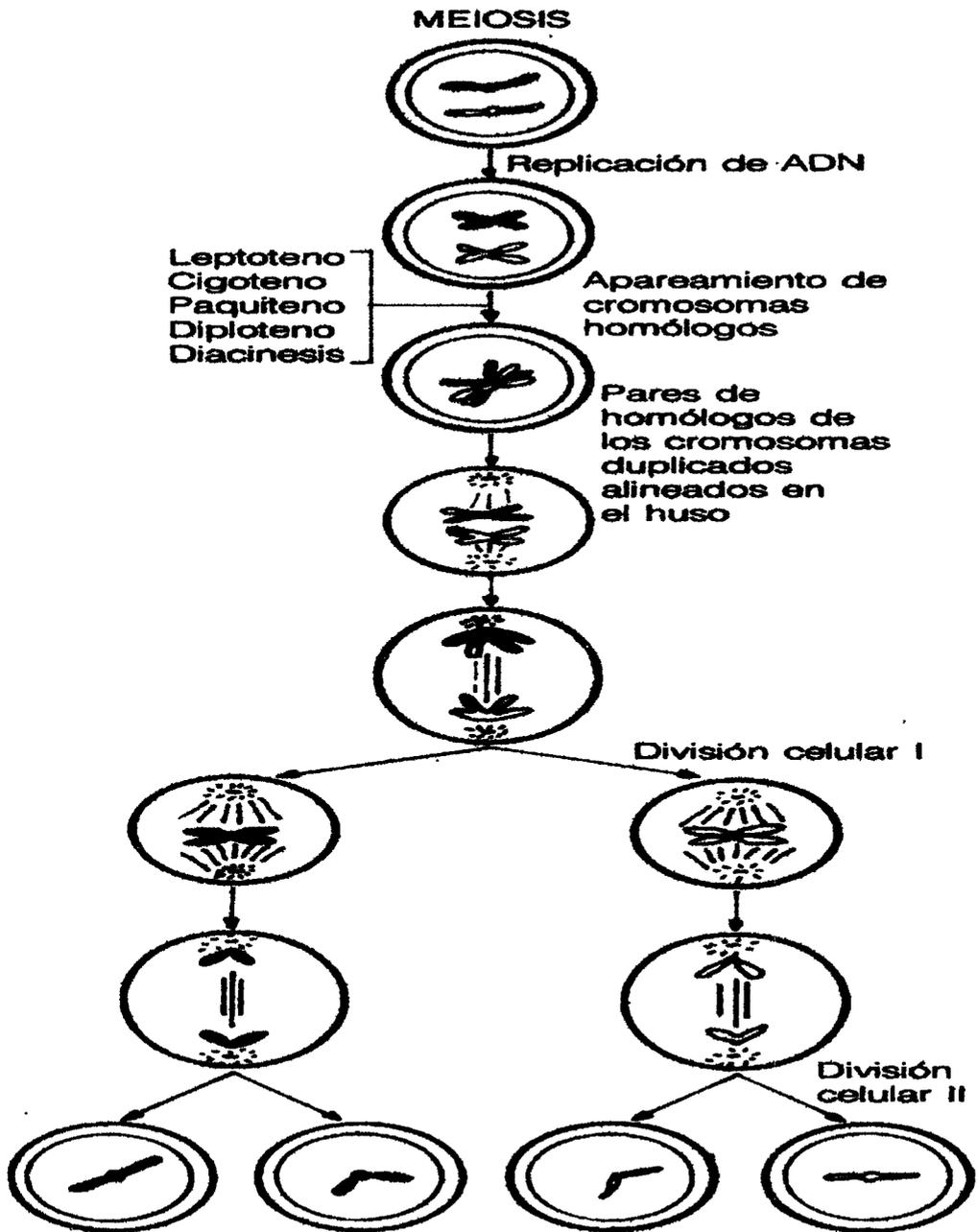


FIGURA 4. Diagrama Del Proceso De La Meiosis. S3lo Se Muestra Un Par De Cromosomas (Garc3a-Nieto et al. 1986).

SISTEMA DE MICRONÚCLEOS EN CÉLULAS MITÓTICAS DE *Allium cepa*

VENTAJAS DEL SISTEMA

La cebolla común *Allium cepa* es uno de los sistemas que posee las características de:

- Bajo costo.
- Se encuentra disponible todo el año.
- No requiere de un invernadero, ni de condiciones costosas para su propagación.
- Los bulbos producen un gran número de raíces en poco tiempo (3 a 4 días).
- Contiene 8 pares de cromosomas ($2n = 16$) relativamente grandes y observables al microscopio óptico.

El ensayo de micronúcleos es una técnica sencilla, rápida y eficiente que el análisis de aberraciones cromosómicas y anomalías mitóticas en metafase y anafase, que además presenta otras ventajas: los micronúcleos producidos son bastantes claros y se detectan fácilmente al microscopio óptico.

CICLO CELULAR DE *Allium cepa*

El ciclo celular de *Allium cepa* tiene una duración de 23 horas a 21°C; ha sido observado que el tiempo de la mitosis es de 4 horas, y la duración de los períodos de la interfase son: G1 = 3.3 horas, S = 12 horas y G2 = 3.7 horas, aproximadamente (Grant, 1982). La profase tiene una duración de 64 minutos, metafase: 18 minutos, anafase: 13 minutos y telofase: 42 minutos.

ESTUDIOS REALIZADOS CON EL SISTEMA *Allium cepa*

Se han probado 148 compuestos agentes químicos en 165 ensayos de los cuales el 76% han dado respuesta positiva. Entre algunos de los compuestos probados que han dado tal respuesta están el colorante naranja de acridina: 2,6 diclorofenos, acetato de plomo, hidróxido de metil mercurio y sacarina, entre otros (Grant, 1982).

Se encontró actividad mutagénica del herbicida Gramoxona a nivel citológico en *Allium cepa*, *Vicia faba*, y en linfocitos de humanos (El-Abidin Salam et al. 1993).

Rodríguez (1992), detectó actividad mutagénica en aguas residuales, mediante un estudio comparativo con dos sistemas biológicos de prueba *Tradescantia* clon 4430 y *Allium cepa*.

Sosa y Covarrubias (1994), al evaluar el efecto genotóxico *in vitro* de los insecticidas piretroides: Permetrina, Cipermetrina y Deltametrina, encontraron que los tres insecticidas demostraron ser capaces de producir un efecto genotóxico, aunque cada uno en distinto grado.

SISTEMA DE MICRONÚCLEOS EN CÉLULAS MEIÓTICAS DE *Tradescantia* CLON 4430

PROPAGACIÓN Y CUIDADOS DE *Tradescantia* CLON 4430

El clon 4430 de *Tradescantia* es un híbrido interespecífico entre *Tradescantia subcalis* y *Tradescantia hirsutiflora*. Pertenece a la familia de las comelináceas, se propaga por reproducción vegetativa, florece diariamente, es herbácea con hojas estrechas que rematan en punta. Las inflorescencias, se localizan en la parte terminal de la rama, están formadas por aproximadamente 16 yemas florales y cada una posee seis anteras que contienen células en diferentes fases del desarrollo meiótico, a las que Ma (1983) ha estudiado desde el inicio del ciclo, hasta el momento en que se abren las anteras. Como las yemas se encuentran en distintas etapas del desarrollo, presentan diferencias hasta entre anteras hermanas y aún dentro de la misma antera (Ma, 1983).

VENTAJAS DEL SISTEMA

Su número cromosómico es pequeño. La prueba de micronúcleos en células meióticas de *Tradescantia* clon 4430 fue desarrollado durante los años 1976-1978 y su estandarización y validación fue efectuada por Ma et al. 1981, el cual es un sistema rápido, simple y eficiente para determinar la toxicidad o clastogenicidad (agente que puede romper los cromosomas) de contaminantes ambientales en estado líquido, fármacos y aditivos para alimentos (Ma, 1983).

MEIOSIS De *Tradescantia* CLON 4430

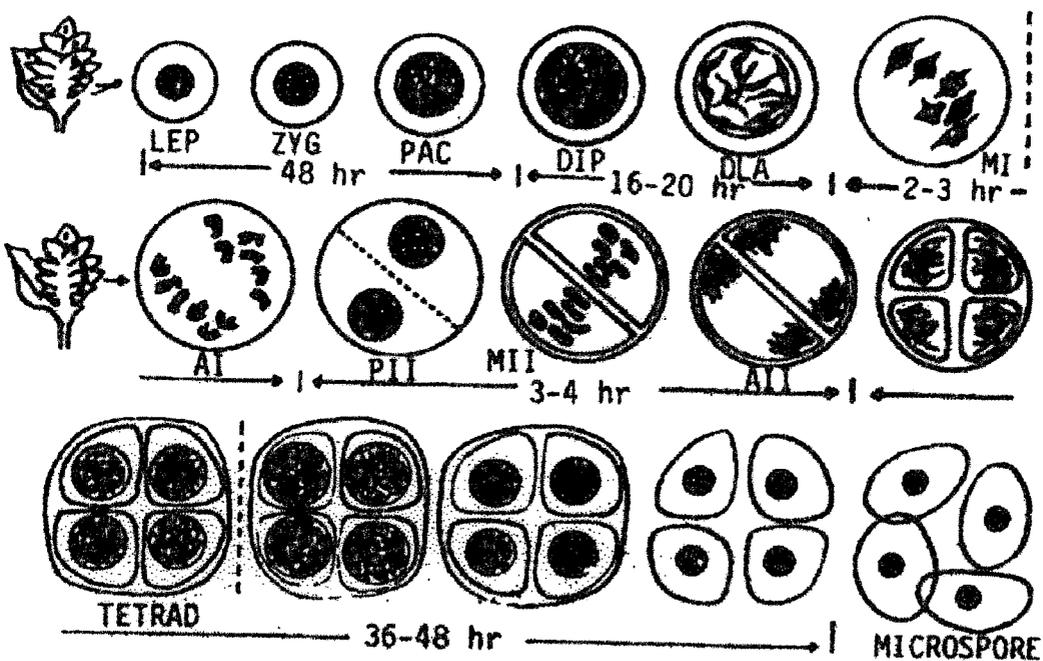


FIGURA 5. Duración Y Morfología General De Cada Una De Las Etapas De La Meiosis De *Tradescantia* Clon 4430 (Ma, 1983).

Las células en cada una de las etapas de la meiosis, están sincronizadas y con tiempos bien conocido para cada uno de los botones de las flores (Taylor, 1950). Se han estudiado las distintas fases del ciclo meiótico en *Tradescantia*, y se determinan los tiempos que permanecen las células en cada estadio desde la

profase I (leptotena, cigotena, paquitena, diplotena y diacinesis) con un tiempo total de 64 a 68 horas. Después sigue el proceso hasta la fase de tétradas con 41 a 55 horas. Estas son las etapas de mayor importancia (Ma, 1983).

Los micronúcleos en las células meióticas de *Tradescantia* se originan en estados tempranos de la meiosis y se forman cuando algunos cromosomas retardados o fragmentos acéntricos, son excluidos del núcleo al final de la división, y se observan en la etapa de tétradas del ciclo meiótico (Ma, 1983).

ESTUDIOS REALIZADOS CON EL SISTEMA *Tradescantia* CLON 4430

Este bioensayo se ha utilizado para determinar los efectos mutagénicos de los rayos X (Sparrow et al. 1972), y de contaminantes como el 1,2-dibromoetano (Ma et al. 1978). También para evaluar la presencia de agentes genotóxicos en aguas residuales (Ruíz-Flores et al. 1992), para el ensayo de genotoxicidad de colorantes sintéticos (Martínez y Velázquez, 1995), agentes gaseosos (Ma et al. 1996) y en fármacos anticonvulsivos (Guerrero, 1998).

Cabe señalar que en este trabajo se eligieron las mismas concentraciones utilizadas en el estudio genotóxico del principio activo alfa-asarona de Morales-Ramírez et al. 1992), indicado anteriormente, con el fin de observar el efecto en el sistema de micronúcleos en células meióticas de *Tradescantia* clon 4430 y en células mitóticas de *Allium cepa*.

II. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Estudiar el posible efecto genotóxico de la alfa-asarona en células meióticas de *Tradescantia* clon 4430 y en células mitóticas de *Allium cepa*.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Determinar la concentración del disolvente (etanol) que solubiliza al compuesto alfa-asarona que no sea genotóxica para los dos sistemas de prueba.
2. Conocer las concentraciones óptimas que producen efecto genotóxico en cada uno de los sistemas vegetales.

SISTEMA DE MICRONÚCLEOS EN CÉLULAS MERISTEMÁTICAS

DE *Allium cepa*

OBTENCIÓN DE RAÍCES

Para cada tratamiento se seleccionaron bulbos de cebolla de tamaño uniforme (10 a 30 gr), habiendo quitado la superficie exterior de manera que los ápices de las raíces quedaran expuestos. Se sumergieron en agua corriente (cerca de una cuarta parte del bulbo), manteniéndolas con aereación constante en la oscuridad a 21° C. Después de 3 a 4 días se obtuvieron raíces de 2 a 3 cm de longitud. De estas raíces con el tratamiento respectivo, se analizó la porción del meristemo donde la división mitótica es más activa.

TRATAMIENTO Y OBTENCIÓN DE PREPARACIONES

Se eligieron bulbos con raíces de aproximadamente 2 a 3 cm de longitud, los cuales se sumergieron (cerca de una cuarta parte del bulbo) en vasos de precipitados con la solución correspondiente: fármaco y testigos respectivos, aereación constante y en la oscuridad a 21°C. Esto fue durante un período de 2 horas de tratamiento, es decir, para que abarcara la etapa S de máxima sensibilidad, en la interfase. Después se enjuagaron las raíces en agua corriente y pasaron a un período de recuperación de 42 horas (duración necesaria para que los cromosomas dañados en la etapa de síntesis del ADN, continúen su ciclo y lleguen nuevamente a la etapa de interfase donde se registra el daño con la formación de micronúcleos).

Posteriormente las raíces fueron enjuagadas, cortadas y fijadas en una solución etanol-ácido acético (3:1 V/V) por 24 horas, al término de lo cual las raíces fueron enjuagadas en etanol al 70% y mantenidas así hasta su observación. Para su tinción las raíces se hidrolizaron con HCl 1N por 7 minutos a 60 °C en baño María. Se enjuagaron después con agua destilada y se colocaron por 20 minutos en

vasos de precipitados que contenían el colorante de Feulgen. Para la elaboración del colorante de Feulgen se disolvieron gradualmente 0.5 gr de fucsina básica en un matraz con 100 ml de agua destilada hirviendo después se dejó enfriar hasta 58°C filtrándolo en embudo de cristal a un frasco ámbar protegido de la luz; se colocó un termómetro y cuando bajó a 26°C se agregaron 10 ml de HCL IN y 0.5gr de metabisulfito de potasio. Después se guardó en la oscuridad a temperatura ambiente. Al término de 24 horas se observó si la solución era transparente o si presenta un color ámbar se le agrega 0.5 gr de carbón activado, dejándolo reposar 24 horas en cámara fría (4 °C) y oscura. Por último se filtra al vacío, se guarda protegido de la luz en un frasco ámbar en refrigeración. Posteriormente se colocó cada raíz en un portaobjetos, bajo un estereomicroscopio, conteniendo una gota de ácido acético al 45%, en donde fue removida la membrana que cubre la porción meristemática y separada del resto de la raíz. Se realizó el método de presión (técnica de aplastamiento para obtener un buen extendido de células).

OBSERVACIÓN Y REGISTRO DE CÉLULAS

Las preparaciones de los diferentes grupos experimentales se leyeron simultáneamente, marcándolas con claves.

El registro se llevó a cabo en un microscopio óptico, enfocado en un lugar al azar bajo una amplificación de 40x contándose 2,000 células por preparación y se registraron las células interfásicas normales, y las que contenían uno, dos, tres o más micronúcleos y se calculó el índice mitótico.

Índice mitótico = $\text{No. de células en división} / \text{Total de células (2,000)} \times 100$.

De cada grupo experimental se observaron 5 preparaciones, las cuales correspondieron a 5 raíces diferentes de un mismo bulbo de cebolla.

SISTEMA DE MICRONÚCLEOS EN CÉLULAS MEIÓTICAS

DE *Tradescantia* Clon 4430

CULTIVO DEL MATERIAL BIOLÓGICO

Las plantas *Tradescantia* clon 4430 se cultivaron en un invernadero apropiado en macetas con las condiciones óptimas de humedad (60 a 80%), temperatura 21 a 26 °C durante el día y 23 °C durante la noche, con un fotoperíodo (1,800 ft-candelas de luz fluorescente y 180 ft-candelas de luz incandescente). Para su desarrollo se plantaron en una mezcla de arena (lavada con hipoclorito de sodio y enjuagada perfectamente), tierra de hoja en una proporción de (1:3) y se regaron con agua corriente cuando así lo requerían; las flores se cortaron diariamente de acuerdo con el método de Ma (1983).

La reproducción vegetativa se realizó desenmacollando las raíces y separando así los tallos surgidos de ellas.

Fue necesario cortar las hojas adultas para evitar que anidaran los insectos y para favorecer el crecimiento del tallo y la formación de inflorescencias vigorosas.

Para su buen desarrollo de las plantas se requirió una mezcla de fertilizantes sólidos de nitrógeno, fósforo y potasio en una proporción de 5:10:5 y micronutrientes, el cual se estuvo administrando varias veces cada 30 días.

TRATAMIENTO Y OBTENCIÓN DE PREPARACIONES

Para observar el posible daño en células meióticas de *Tradescantia* se seleccionaron inflorescencias con tallos de aproximadamente 10 cm de largo y se sumergieron en vasos de precipitado con cubierta de papel aluminio perforado. Estas se distribuyeron en grupos: dos para los controles (etanol 1% y agua destilada) y uno para las tratadas con el compuesto alfa-asarona, con 12

inflorescencias cada uno, según se indica en el diseño experimental; el tratamiento se aplicó vía tallo según el método establecido por Ma (1983), es decir, con 6 horas de exposición, período en el cual la sustancia a probar llega a la yema que contiene células en profase I, de más sensibilidad en la meiosis. Posteriormente, se enjuagaron los tallos en el chorro de agua y se pasaron a recuperación por 24 horas, mejor referido como tiempo meiótico en donde las células posibles dañadas puedan llegar a la etapa de tétradas tempranas observando en ellas los micronúcleos formados, es decir, rompimientos de los cromosomas. Después de este período las inflorescencias se sumergieron en una mezcla de etanol-ácido acético (3:1 V/V) durante 24 horas para detener el ciclo meiótico, al término de este período las inflorescencias se pasaron por agua corriente y se colocaron en etanol al 70%, así se conservaron hasta su observación.

De cada inflorescencia se seleccionó la yema que contenía las células en la etapa de tétradas, la cual se colocó en un portaobjetos con una gota de colorante de aceto-carmín, preparado con 0.5 gr de carmín con 45 ml de ácido acético glacial y 55 ml de agua destilada. Se hirvió durante 10 minutos a reflujo. Se agitó y se filtró cuando se enfrió (Sharma y Sharma, 1980). En un estereomicroscopio, se disectaron y separaron las anteras, las que fueron maceradas para asegurar que la mayoría de las tétradas quedaran libres; una vez hecho esto se desecharon los fragmentos de la pared de la antera y se colocó cuidadosamente un cubreobjetos sobre las células suspendidas en el colorante.

Después se procedió a calentar ligeramente la preparación; enseguida se presionó, suavemente con la mano, bajo varios capas de papel para quitar el exceso de colorante.

Las preparaciones de los diferentes grupos experimentales se leyeron siguiendo el método de doble ciego, marcándolos con claves y desconociendo a que grupo experimental pertenecían.

OBSERVACIÓN Y REGISTRO DE TÉTRADAS

La identificación y el recuento de micronúcleos están basados en tres criterios específicos que incluyen: morfología, citoquímica y orientación dentro de la célula. El criterio morfológico incluye la textura (debe ser comparable a la de los núcleos principales), la forma (de redonda a oval, con bordes bien definidos), además, el diámetro del micronúcleo no debe ser mayor que un tercio del diámetro de los núcleos principales. El criterio citoquímico consiste en una reacción positiva a la tinción con acetocarmín. En cuanto a su orientación en la célula, los micronúcleos deben localizarse dentro del citoplasma y en el mismo plano focal que los núcleos principales, pero deben estar bien determinados y separados físicamente de éstos (Livingston et al. 1990; Ren et al. 1991).

El registro se llevó a cabo en un microscopio óptico, se enfocó en un lugar al azar bajo una amplificación de 40x y se contaron 300 células por preparación. Se registraron las tétradas normales y las que contenían uno, dos, tres o más micronúcleos.

Se reportó el número de micronúcleos X 100 células (%MCN). De cada grupo experimental se leyeron 5 preparaciones, las cuales correspondieron a 5 inflorescencias diferentes.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO PARA BIOENSAYOS VEGETALES

Los resultados obtenidos en ambos sistemas se analizaron mediante la prueba de Tukey ideal para probar la hipótesis nula respecto a la igualdad de todos los posibles pares de medias del tratamiento. Cuando se utiliza esta prueba, se elige un nivel global de significación α . La probabilidad es α entonces, que una o más de las hipótesis nulas es falsa (Daniel, 1996).

El programa estadístico que se utilizó fue Jump In.

IV. RESULTADOS

En la primera columna de la Tabla VII, se muestra el tratamiento que se probó con las concentraciones de 1, 2 y 3% de etanol y su control de agua destilada.

En la columna dos, se indica el número de muestras que se leyeron, probándose cada concentración por triplicado.

En la columna tres, se señala la frecuencia de micronúcleos en las células mitóticas de *Allium cepa* tanto del testigo como de sus concentraciones de etanol.

En la columna cuatro, se encuentra la transformación de arcoseno (Zar, 1984), que permite cambiar el valor que está en porcentaje en la columna tres a números normales para así poder utilizar la prueba de múltiples rangos de Tukey. Por medio de esta prueba se demostró efecto genotóxico a la concentración del 3% de etanol, el cual es imposible utilizarlo como disolvente de alfa- asarona.

En la Figura 6, se observa en el eje de las abscisas el testigo de agua destilada y las concentraciones 1, 2 y 3% de etanol. En el eje de las ordenadas está la escala de las medias del tratamiento. Se puede apreciar el resultado de cada concentración siendo la media cada punto central del diamante con su error estándar. Mostrando que el testigo agua destilada con referencia a la concentración del 3% de etanol hay un efecto genotóxico habiendo una distancia muy notoria con las anteriores medias, mientras que con las concentraciones de 1 y 2% de etanol no se manifiesta tal significancia con respecto al testigo.

TABLA VII. Sistema De Micronúcleos En Células Mitóticas De *Allium* cepa Inducidas Por Etanol.

TRATA- MIENTO	REPE- TICIÓN	%	TRANSFOR- MACIÓN Arcoseno	MEDIA — X	ERROR ESTÁNDAR	DIFERENCIA DE MEDIAS CON RESPECTO AL TESTIGO AGUA DESTILADA	PRUEBA DE TUKEY
A.D.	10	0.65	12.02	1.20200	0.35137	1.31970	N.S
1	15	0.75	16.2	1.08000	0.28689	1.08272	N.S
2	15	1.55	25.14	1.67600	0.28689	0.73072	N.S
3	15	10.1	65.83	4.38867	0.28689	1.98195	*

* = Significativo ($p < 0.05$)

N.S. = No significativo ($p > 0.05$)

A.D. = Agua destilada.

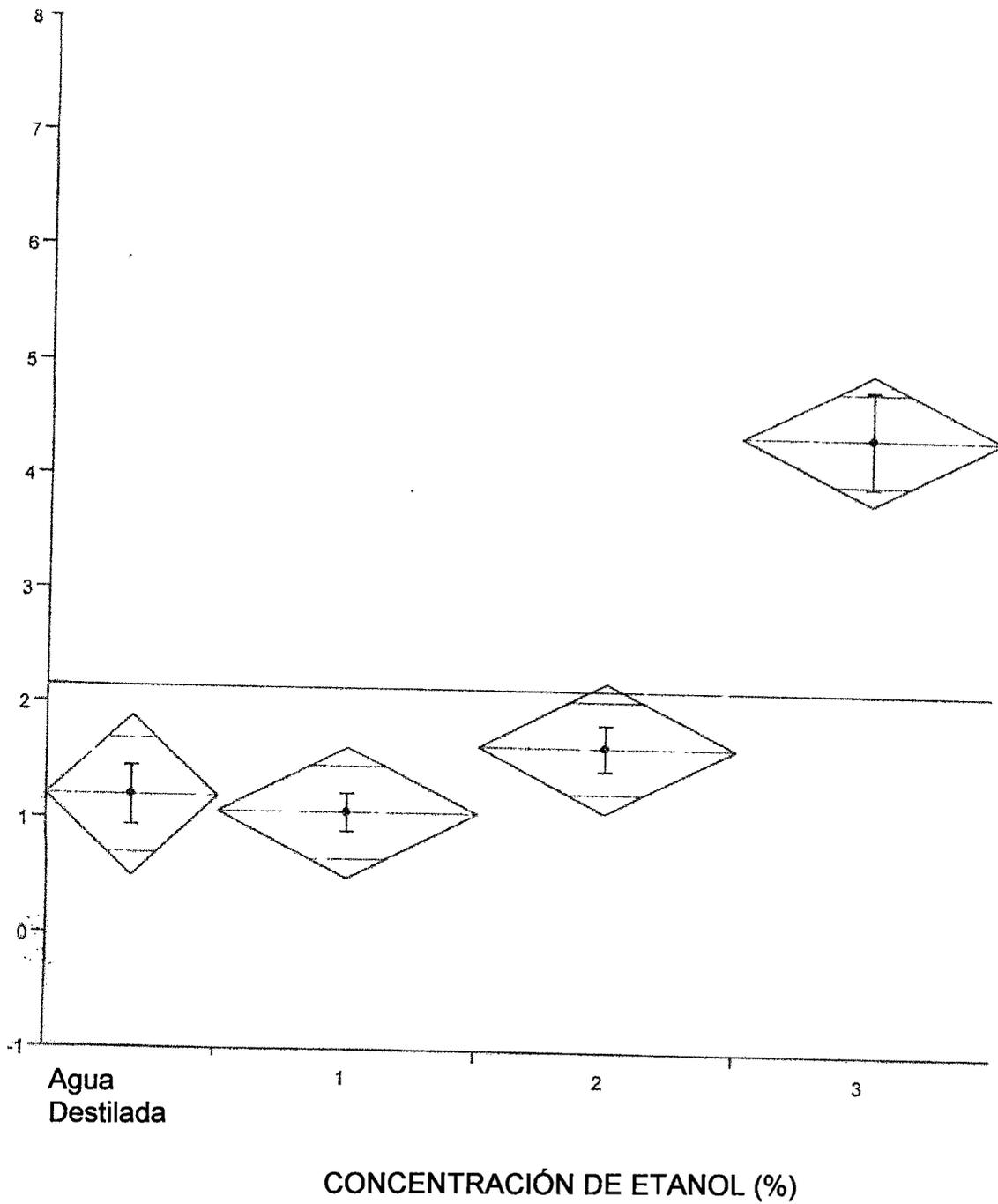


FIGURA 6. Sistema De Micronúcleos Inducidos Por Etanol En Células Mitóticas De *Allium cepa* Por Medio De La Prueba de Tukey.

En la Tabla VIII, se registra el índice mitótico (células en división) inducido por etanol a las concentraciones de 1, 2 y 3%, probándose cada una por triplicado con sus respectivos testigos de agua destilada. El testigo varía su índice mitótico de 6.94 a 10.04%, obteniendo resultados muy semejantes en la concentración del 1% de etanol; sin embargo, a la concentración del 2% empieza a disminuir por abajo del porcentaje normal 5.7% promedio de división celular a 5.3% presentando el inicio de una toxicidad y en la concentración del 3% disminuyó a 0.32% y en una de las repeticiones se inhibió totalmente siendo muy tóxica para el sistema de prueba.

TABLA VIII Porcentaje Del Índice Mitótico En Células Mitóticas De Raíces De *Alium cepa* Inducidas Con Etanol.

Testigo negativo (Agua destilada)	ÍNDICE MITÓTICO ¹		
	Concentraciones de etanol		
	1%	2%	3%
I.M.	I.M.	I.M.	I.M.
10.04	9.71		
	8.15		
	6.13		
6.94		5.7	0.32
		5.31	0
		5.43	0.06

¹ El valor es el número de células en división / 2000 (total de células por cada preparación) X 100 correspondiendo al promedio de 5 preparaciones de raíces diferentes.

En la primera columna de la Tabla IX se muestra el tratamiento que se probó con las concentraciones de 1, 5, y 25% de etanol y su testigo de agua destilada.

En la columna dos, está el número de muestrás que se leyeron, probándose cada concentración por triplicado.

En la columna tres, se señala la frecuencia de micronúcleos en las células meióticas de *Tradescantia* clon 4430 tanto del testigo de sus concentraciones de etanol.

En la columna cuatro, se encuentra la tranformación de arcoseno (Zar, 1984), y utilizando la prueba de múltiples rangos de Tukey se demuestra un efecto genotóxico en la concentración al 25% de etanol, es decir, hubo un incremento notable en la frecuencia de la aparición de micronúcleos en relación con su testigo de agua destilada.

En la Figura 7, se presenta en el eje de las abscisas el testigo agua destilada y las concentraciones 1, 5 y 25% de etanol. En el eje de las ordenadas está la escala de las medias del tratamiento, en donde se puede ver el resultado de cada concentración siendo la media cada punto central del diamante con su error estándar. Observando que el testigo de agua destilada con referencia a la concentración del 25% de etanol hay un efecto genotóxico dándose un ascenso mucho mayor que con las anteriores medias, sin embargo, aunque la concentración del 5% no muestra genotoxicidad, sí hay un aumento en la frecuencia de micronúcleos, por lo que la concentración del 1% de etanol registra un similar comportamiento con el testigo de agua destilada.

Así la concentración al 1% de etanol fue la óptima para solubilizar la alfa – asarona, sin producir un daño genotóxico en ambos sistemas de prueba.

Tabla IX. Sistema De Micronúcleos En Células Meióticas De *Tradescantia* Clon 4430 Inducidas Con Etanol.

TRATA- MIENTO %	REPE- TICIÓN	%	TRANS- FORMA- CIÓN Arcoseno	MEDIA — X	ERROR ESTÁN- DAR	DIFERENCIA DE MEDIAS CON RESPECTO AL TESTIGO DE AGUA DESTILADA	PRUEBA DE TUKEY
A.D.	15	61.61	172.39	11.4927	0.44344	1.66056	NS
1	15	55.28	163.46	10.8973	0.44344	1.06523	NS
5	15	77.26	194.6	12.9733	0.44344	0.17989	NS
25	15	196.95	317.63	21.1753	0.44344	8.02211	*

* = Significativo ($p < 0.05$)

N.S. = No significativo ($p > 0.05$)

A.D. = Agua destilada.

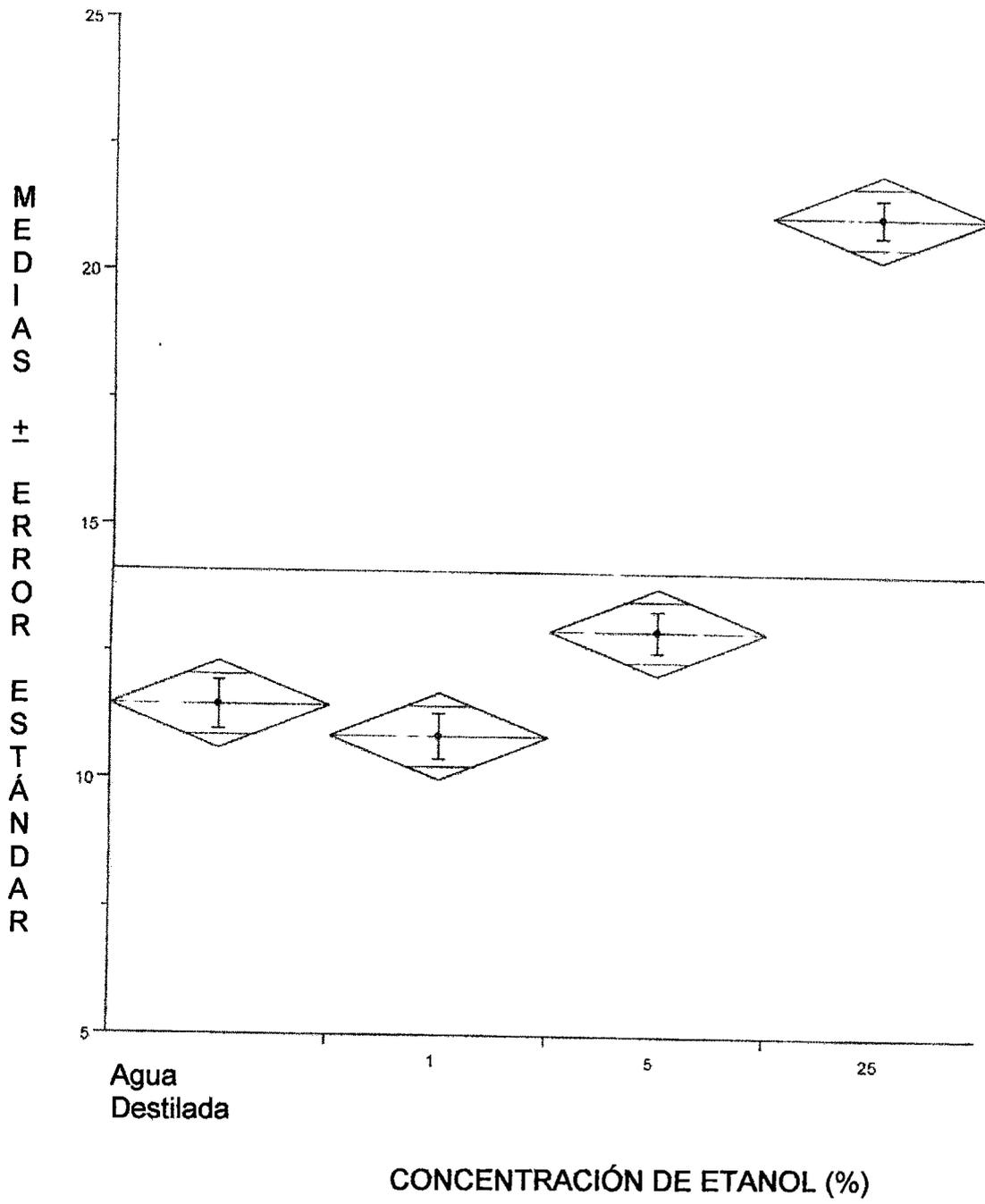


FIGURA 7. Sistema De Micronúcleos Inducidos Por Etanol En Células Meióticas De *Tradescantia* Clon 4430 Por Medio De La Prueba de Tukey.

En la primera columna de la Tabla X se indican las concentraciones de alfa – asarona ensayadas y su testigo de agua destilada y etanol 1%.

En la columna dos, se encuentra el número de muestras leídas, probándose cada concentración por triplicado.

En la columna tres, se señala la frecuencia de micronúcleos en las células mitóticas de *Allium cepa*.

En la columna cuatro, se encuentra la transformación arcoseno (Zar, 1984), y utilizando la prueba de múltiples rangos de Tukey se demuestra que se produce genotoxicidad a las concentraciones de 150, 180 y 210 $\mu\text{g/ml}$ con el control de agua destilada; sin embargo, con relación al testigo etanol 1% se nota tal efecto sólo a 210 $\mu\text{g/ml}$. Con la concentración de 250 $\mu\text{g/ml}$ se observa un descenso en la frecuencia de micronúcleos con respecto a los controles indicando un aparente error, por otra parte, aunque no se demuestre el efecto por la baja formación de micronúcleos, en la siguiente Tabla se presenta el efecto que produce en la división celular.

En la Figura 8 se presentan en el eje de las abscisas el testigo de agua destilada y al 1% , con sus respectivas concentraciones del compuesto alfa – asarona de 30, 60, 90, 150, 180, 210 y 250 $\mu\text{g/ml}$ y en el eje de las ordenadas las escalas de medias, donde cada punto central del diamante señala la media con su error estándar. Entre los testigos y sus respectivas concentraciones de 30, 60, 90 y 250 $\mu\text{g/ml}$, existe un comportamiento similar. Cabe señalar que esta última concentración se refiere a la frecuencia de micronúcleos. Por otro lado con 150, 180 y 210 $\mu\text{g/ml}$ se nota un claro distanciamiento con los testigos corroborado por la prueba de Tukey.

TABLA X. Sistema De Micronúcleos En Células Mitóticas De *Allium* cepa Inducidas Con Alfa-asarona.

RATA- IENTO (μ g/ml)	REPE TI- CIÓN	%	TRANS- FORMA- CIÓN ARCO- SENO	MEDIA — X	ERROR ESTÁN- DAR	DIFERENCIA DE MEDIAS CON RESPECTO AL TESTIGO AGUA DESTILADA	PRUE- BA DE TUKEY	DIFERENCIA DE MEDIAS CON RESPECTO AL TESTIGO ETANOL	PRUEBA DE TUKEY
A.D.	30	1.05	26.13	0.87100	0.11852	0.52304	NS	0.36704	NS
E.T. 1%	30	1.35	30.81	1.02700	0.11852	0.36704	NS	0.52304	NS
30	45	1.7	39.77	0.88378	0.09677	0.46469	NS	0.33425	NS
60	45	1.85	42.86	0.95244	0.09677	0.39603	NS	0.40291	NS
90	45	2.25	48.6	1.08000	0.09677	0.26847	NS	0.42447	NS
150	45	3.1	63.25	1.40556	0.09677	0.057086	*	0.09891	NS
180	45	3.1	64.24	1.42756	0.09677	0.79086	*	0.07691	NS
210	45	3.75	72.15	1.60333	0.09677	0.254864	*	0.098864	*
250	45	3.45	57.91	1.28689	0.09677	0.06158	NS	0.21758	NS

* = Indica significativo ($p < 0.05$)

N.S. = Indica no significativo ($p > 0.05$)

A.D. = Agua Destilada

E.T. 1% = Etanol al 1%

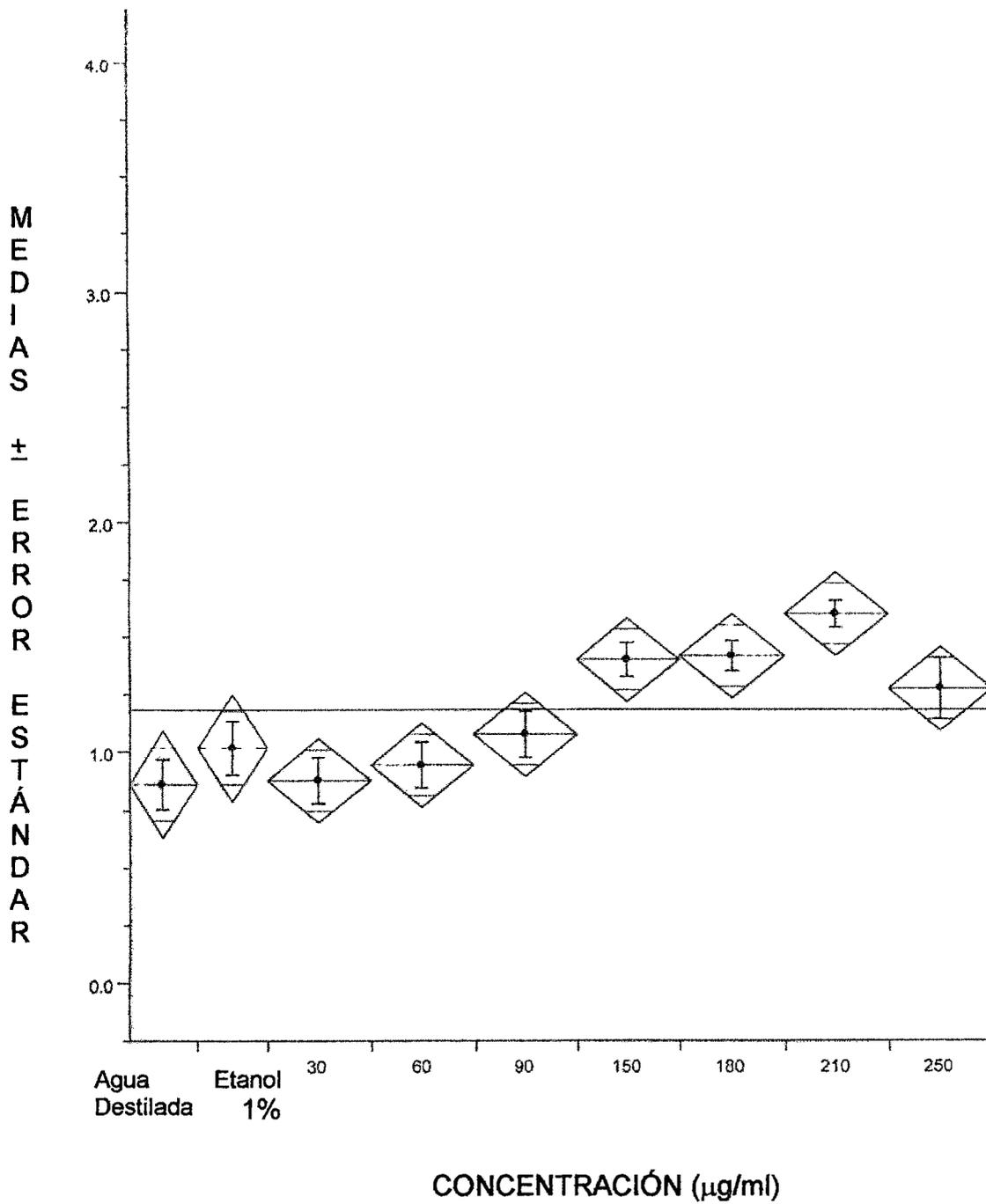


FIGURA 8. Sistema De Micronúcleos Inducidos Por Alfa - asarona En Células Mitóticas De *Allium cepa* Por Medio De La Prueba de Tukey.

En la Tabla XI se observa el índice mitótico (células en división) inducido por la alfa – asarona a 30, 60, 90, 150, 180, 210 y 250 $\mu\text{g/ml}$, probándose cada una por triplicado sus respectivos testigos de agua destilada y etanol 1%. El testigo de agua destilada varía su índice mitótico de 9.27 a 10.9, y el etanol 1% de un 7.57 a 9.73%, obteniendo resultados muy semejantes a 30, 60, 90, 150, 180 y 210 $\mu\text{g/ml}$ de alfa – asarona; sin embargo, a la concentración de 250 $\mu\text{g/ml}$ disminuyó de 5.94% hasta la inhibición total, es decir, por debajo del porcentaje normal 5.7% promedio de número de células en división; mostrando toxicidad para el sistema de prueba. Se apreció la formación de células picnóticas (condensación de la cromatina, impidiendo la división celular).

Tabla XI. Porcentaje De Índice Mitótico En Células Mitóticas De Raíces De *Allium cepa* Inducidas Con Alfa-asarona.

Agua destilada	Etanol 1%	ÍNDICE MITÓTICO (I.M.)						
		Concentraciones de alfa asarona (µg/ml)						
		30	60	90	150	180	210	250
9.33	9.59			8.48	9.14			
				9.23	9.55			
				9.55	9.58			
				8.28	9.33			
				9.52	8.97			
9.59	9.73			9.73	9.46			
				9.79				
				9.42				
				9.4				
			9.76					
			9.56					
9.43	9.68		9.62					
			9.52					
			9.69					
			9.32					
		9.37	9.18		9.57			
		8.89	9.42		9.55			
9.43	9.37	9.14	9.11		9.59			
		9.05						
		9.4						
		9.36						
		8.97						
10.9	7.57	9.46						
		9.33						
								4.69
								0
								4.4
								4.45
9.43	9.37							0
								5.6
								5.94
								0
								0.12
						9.18		
						9.11		
						9.42		
10.9	7.57					9.53		
						8.94		
						9.0		
						9.11		
						10.0		
						9.89		
						9.9		
						9.62		
9.33	9.56					9.27		
						9.4		
						9.45		
						9.42		
						7.37		
9.27	9.01					9.73		
						10.51		

1 El valor es el número de células en división/2000 (total de células por cada preparación) X 100 correspondiendo al promedio de 5 preparaciones de raíces diferentes.

En la primera columna de la Tabla XII aparecen las concentraciones y sus testigos de agua destilada y etanol.

En la columna dos, está el número de muestras que se leyeron, probándose cada concentración por triplicado.

En la columna tres, se señala la frecuencia de micronúcleos en las células mitóticas de *Tradescantia* clon 4430 tanto del testigo como de sus concentraciones de etanol.

En la columna cuatro, se encuentra la transformación de arcoseno, (Zar, 1984), y utilizando la prueba de múltiples rangos de Tukey, se demuestra un efecto genotóxico a las concentraciones de 150, 180, 210 y 250 $\mu\text{g/ml}$ con el testigo agua destilada, por otra parte con relación al testigo etanol 1% se nota tal efecto a partir de la concentración de 180 $\mu\text{g/ml}$.

En la Figura 9, se presenta en el eje de las abscisas en testigo de agua destilada y el testigo etanol 1%, con sus respectivas concentraciones del compuesto alfa – asarona, y en el eje de las ordenadas la escala de medias, donde cada punto señala la media con su error estándar. Resultando que a partir de la concentración de 150 $\mu\text{g/ml}$ empieza a ascender y a alejarse de los controles, incrementándose notablemente con la concentración.

Tabla XII. Sistema De Micronúcleos En Células Meióticas De *Tradescantia* Clon 4430 Inducidas Por Alfa-asarona.

TRATA MIEN- TO μg/ml	RE- PE- TI- CIÓN	%	TRANS- FORMA CIÓN ARCO- SENO	MEDIA \bar{X}	ERROR ESTÁN- DAR	DIFERENCIA DE MEDIAS CON RESPECTO AL TESTIGO AGUA DESTILADA	PRUE- BA DE TUKEY	DIFERENCIA DE MEDIAS CON RESPECTO AL TESTIGO ETANOL	PRUE BA DE TU- KEY
A.D.	35	116.86	363.07	10.3734	0.24306	1.07247	NS	0.40618	NS
E.T. 1%	35	132.21	386.39	11.0397	0.24306	0.40618	NS	1.07247	NS
30	45	162.47	486.77	10.8173	0.21436	0.56723	NS	0.78875	NS
60	45	157.17	478.82	10.6404	0.21436	0.74412	NS	0.61186	NS
90	45	179.18	511.76	11.3724	0.21436	0.01212	NS	0.67840	NS
150	45	182.87	515.74	11.4609	0.21436	0.07633	*	0.58996	NS
180	45	198.52	543.21	12.0713	0.21436	0.68677	*	0.2049	*
210	45	243.86	601.54	13.3676	0.21436	1.98299	*	1031671	*
250	45	265.2	651.65	14.4811	0.21436	3.09655	*	2.43026	*

* = Indica significativo ($p < 0.05$)

N.S = Indica no significativo ($p > 0.05$)

A.D. = Agua Destilada

E.T. = Etanol al 1%

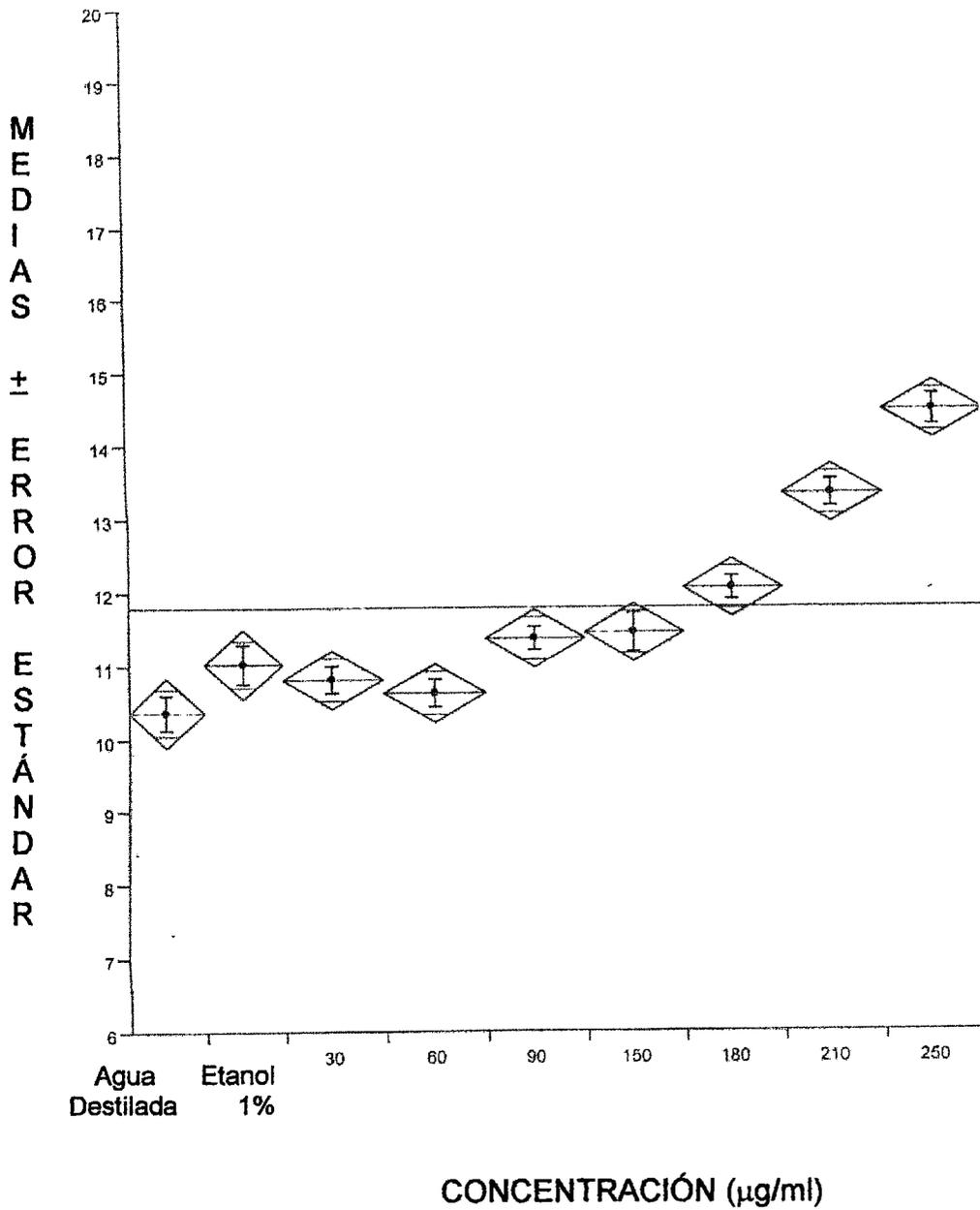


FIGURA 9. Sistema De Micronúcleos Inducidos Por Alfa - asarona En Células Meióticas De *Tradescantia* Clon 4430 Por Medio De La Prueba de Tukey.

V. DISCUSIÓN

El presente trabajo ha permitido evaluar la alfa-asarona en cuanto al efecto genotóxico que puede ocasionar en células meióticas de *Tradescantia* clon 4430 y en células en interfase de raíces de *Allium cepa*.

Como se puede observar son posibles los daños a la estructura del ADN como lo hacen por ejemplo las radiaciones UV, rayos X, los cuales producen cambios en el ADN como puentes de pirimidinas, y hasta las radiaciones ionizantes que producen radicales libres pudiendo desencadenarse en efectos carcinógenos.

Empero, existen mecanismos de reparación del ADN en donde el mejor comprendido implica la separación de dímeros de pirimidina (por lo común timinas enlazadas adyacentes covalentemente en la misma hebra). Los dímeros de timina se inducen fácilmente en bacterias mediante luz ultravioleta. Estos dímeros son letales si no se reparan, debido a que interfieren con la replicación normal de la progenie de hebras de ADN. Existen al menos tres mecanismos conocidos para reparar dímeros de pirimidinas.

- 1) Fotorreactivación: Algunos dímeros de pirimidinas pueden eliminarse por la acción de una enzima que se activa al absorber luz azul y como son susceptibles al calor, éstas rompen el puente y reparan, aunque no se sabe mucho en relación con la química de este proceso de (Stansfield, 1992).
- 2) Reparación por excisión: Este mecanismo incluye cuatro pasos. a) Una endonucleasa llamada UV hace un corte en una hebra simple sobre el extremo 5' cerca del dímero. b) La actividad de exonucleasa 5' → 3' de la ADN polimerasa I elimina los nucleótidos cerca del corte, incluyendo al dímero. c) Una de las ADN polimerasas (posiblemente pol I) sintetiza una hebra reemplazadora correcta de 5' a 3' mediante el uso de la información de la hebra complementaria intacta.

d) La polinucleótido ligasa sella la ruptura. La reparación puede iniciarse tan pronto como se forma el dímero de pirimidina.

- 3) Reparación SOS: Esta es una forma de replicación sujeta a error que repara lesiones en el ADN sin tomar en cuenta la resaturación de la secuencia original de bases. Este tipo de reparación puede dispararse por mutágenos químicos que alteran las propiedades de los puentes de hidrógeno de las bases o por mutaciones inducidas por radiación. Se conoce poco en relación con la naturaleza de este mecanismo de reparación de emergencia (Stansfield, 1993).

Aunque existen, como se citó anteriormente, mecanismos de reparación que tratan de subsanar el daño, éste puede ser tan grave o aquéllos no ser tan eficientes que se produzcan alteraciones estructurales. Es decir, la reversibilidad o la irreversibilidad dependerá de la capacidad de regeneración del órgano, frente a la magnitud del tejido o de lo significativo de la exposición.

Por lo que hace a este trabajo de investigación se pudo determinar que la alfa – asarona indujo claramente incrementos en la frecuencia de micronúcleos en células madres de polen (en etapa de tétradas) de *Tradescantia* clon 4430 y en células en interfase de raíces de *Allium cepa*. La alfa – asarona induce una respuesta genotóxica con las concentraciones de 180, 210 y 250 µg/ml cuantificado por la frecuencia de micronúcleos producidos por rompimientos cromosómicos, observándose que el efecto se incrementa con la concentración.

También investigaciones realizadas por Mohar–Betancourt et al. 1986, utilizando la prueba de Ames para evaluar la prueba de la alfa-asarona, obtiene efectos mutagénicos. Por lo que en el sistema de micronúcleos en células meióticas de *Tradescantia* clon 4430 y en el sistema de Ames comparten algunas características entre las que sobresalen la universalidad del código genético y los mecanismos de transcripción y traducción de la información hereditaria. Esto se

reafirma con los trabajos de Ma et al. 1984, el cual realizaron un estudio donde prueba 140 compuestos diferentes entre bebidas comunes, compuestos químicos y fármacos utilizando el sistema de micronúcleos en células meióticas de *Tradescantia* y el sistema de Ames y encuentra una correlación de aproximadamente 67% de resultados positivos.

En el sistema de micronúcleos en células mitóticas de *Allium cepa*, se encontró que la alfa-asarona induce un efecto genotóxico a la concentración de $\mu\text{g/ml}$ manteniendo su índice mitótico constante por arriba del 6.5%. Sin embargo, la concentración de 250 $\mu\text{g/ml}$ produjo toxicidad al inhibir casi totalmente la división celular, encontrándose células picnóticas en varias muestras, lo que indica que la alfa-asarona interacciona con el material nuclear, impidiendo la duplicación de cromosomas, síntesis de ADN y componentes proteicos necesarios para la duplicación de las células, es decir, su efecto se considera como tóxico (Escalza et al. 1983).

En estudios sobre genotoxicidad realizados por Morales-Ramírez et al. 1992, se informó de un ligero pero significativo aumento en la frecuencia de intercambio de cromátides hermanas *in vitro* a las concentraciones de 60, 90, 120, 150, 180 y 210 $\mu\text{g/ml}$ de alfa-asarona. En el presente estudio en células mitóticas de *Allium cepa* se manifestó tal efecto a concentraciones mayores (210 y 250 $\mu\text{g/ml}$). Daños leves y efectos tóxicos en el sistema de *Allium cepa* pueden manifestarse en severas alteraciones en sistemas de prueba de mamíferos (Fiskejö, 1981). Esto puede ser debido a que el metabolismo del mamífero podría transformarlo de inocuo a un compuesto con capacidad mutágena o carcinógena (De Serres, 1978).

Con ésto se debe dar importancia a la investigación preclínica, tratando de evaluar con todas las pruebas disponibles, resultados farmacológicos como toxicológicos obtenidos con modelos *in vivo* e *in vitro* del principio activo, alfa – asarona, del árbol *Guatteria guameri* antes de llegar a conclusiones definitivas.

Llegando el caso de que la alfa – asarona sea considerada como medicamento novedoso en terapéutica, clínicamente deberá establecerse la vía de administración, dosis y tipo de pacientes, así como las contraindicaciones que pudieran aparecer.

Existe también la posibilidad de que se continúen estudiando los análogos de alfa-asarona, para poder evaluar su actividad farmacológica, realizando estudios preclínicos de seguridad y relación estructura – actividad. A éste respecto se han sintetizado recientemente nuevos análogos estructurales que han demostrado eficacia similar a la de la alfa – asarona y que por tanto deben someterse a los mencionados estudios (Chamorro et al. 1998; Labarrios et al. 1999).

VI. CONCLUSIONES

- 1.- La concentración óptima de etanol para disolver el fármaco sin ser genotóxica para los dos sistemas de prueba fue de 1%.
- 2.- Se observó un efecto significativo de genotoxicidad con la alfa-asarona sobre las células meióticas de *Tradescantia* clon 4430 desde la concentración de 180 $\mu\text{g/ml}$, aumentando con la dosis.
- 3.- Para las células meristemáticas de *Allium cepa* se induce genotoxicidad con la concentración de 210 $\mu\text{g/ml}$ y a la de 250 $\mu\text{g/ml}$, hay un efecto tóxico que inhibe el ciclo celular.
- 4.- Las pruebas de micronúcleos en células meióticas de *Tradescantia* clon 4430 y en células mitóticas de *Allium cepa*, fueron sensibles para evaluar el daño genotóxico de la alfa-asarona.
- 5.- Los resultados de esta investigación, indican que el uso de la alfa – asarona debe sujetarse al análisis de todos los estudios del Programa de Toxicidad Preclínica.

VII. LITERATURA CITADA

Baxter, R.M., M.C. Fan and S.L. Kandel. 1962. Cis-trans isomers of asarone, their liquid-gas chromatographic behavior and that of certain other propenylphenolethers. *Can J Chem.* 40:154-7.

Bender, M.A., A.A. Awa, A.L. Brooks, H.J. Evans, P.G. Groer, L.G. Littlefield, C. Pereira, R.J. Preston and B.W. Wachholz. 1988. Current status of cytogenetic procedures to detect and quantify previous exposures to radiation. *Mut. Res.* 196:103-159.

Casarett, L.J. 1991. Toxicology. The basic science of Poisons. pp.269-297. McGraw-Hill [ed.], 5ª Edición U.S.A.

Cooper, G.R. and V. McDaniel. 1970. The determination of glucose by the orthotoluidine method (Filtrate and direct procedure), en MacDonald, R.P. (Ed.): *Standard Methods of Clinical Chemistry*, Academic Press, New York. 6:159-162.

Cortinas de Nava, C., W. Ostrosky y S. Galván. 1980. Manual de Métodos para la investigación de mutágenos y carcinógenos químicos ambientales. Instituto de Investigaciones Biomédicas. Universidad Nacional Autónoma de México. pp.9.

Countryman, P.I. and J.A. Heddle. 1976. The production of micronuclei from chromosome aberrations in irradiated cultures of human lymphocytes. *Mut. Res.* 41:321-332.

Chamorro, G., L. Garduño, E. Martínez, E. Madrigal, J. Tamariz and M. Salazar. 1998. Dominant lethal study of alpha – asarone in male mice. *Toxicol. Left.* 99: 71-77.

Chamorro, G., L. Garduño, A. Sánchez, F. Labarrios, M. Salazar, E. Martínez, F. Díaz and J. Tamariz. 1998. Hipolipidaemic activity of dimethoxy unconjugated propenyl side chain analogs of alpha asarone in mice. *Drug Develop. Res.* 43:105-108.

Chamorro, G., J. Linares, M. Salazar, S. Salazar and T. Mendoza. 1992. Lack of dominant lethal effects in male Wistar rats after long-exposure to alpha-asarone. *Proceedings 4th International Congress on Phytotherapy; Munich: European Scientific Cooperative for Phytotherapy.* pp.10-13.

Chamorro, G., E. Madrigal, L.E. Ruíz and M. Salazar. 1999a. Dominant lethal study of alpha – asarone in male and female rats after short – term treatment. *Med. Sci. Res.* (en prensa).

Chamorro, G., M. Salazar, S. Salazar y T. Mendoza. 1993. Farmacología y Toxicología de *Gutteria gaumeri* y alfa-asarona. México. *Rev. Inv. Clin.* 45:597-604.

Chamorro, G., M. Salazar, J. Tamariz, F. Díaz and F. Labarrios. 1999b. Dominant lethal study of alpha – asarone in male and female mice after subchronic treatment. *Phytother. Res.* (en prensa).

Daniel, W.W. 1996. *Bioestadística. Base para el análisis de las ciencias de la salud.* pp.367-369. Limusa [ed.], 3ª. Edición. México.

Degrassi, F. and M. Rizonni. 1982. Micronucleus test in *Vicia faba* root tips to detect mutagen damage in fresh water pollution. *Mut. Res.* 97:19-33.

De Serres, F.J. 1978. Utilization of higher plant systems as monitors of environmental mutagens. *Environ. Health Perspec.* 27:3-6.

Díaz del Castillo, E., A. Hernández, A. Lerdo de Tejada y S. Karchmer. 1977. Consideraciones terapéuticas sobre el tratamiento de las hiperlipidemias del recién nacido. *Cuad. Nutr.* 2: 273.

Díaz, F., L. Contreras, R. Flores, J. Tamariz, F. Labarrios, G. Chamorro and H. Muñoz. 1990. An efficient synthesis of alpha-asarone. *Org Prep Proc Int.* 23:133-138.

Díaz, F., H. Muñoz, F. Labarrios, G. Chamorro, M. Salazar and M.E. Morelos. 1993. Synthesis and hypolipidemic activity of some alpha-asarone analogs. *Med. Chem. Res.* 3:101-109.

El-Abidin Salam, A.Z., H.A. Ebtissam, A. Hanaiya, I. El-Itriby, A. Wagida and S.A. Mansour. 1993. The mutagenicity of Gramoxone (paraquat) on different eukaryotic systems. *Mut. Res.* 319:89-101.

Escalza, P.F., J. L. López-Campos and D. Cortés. 1983. Action of Vinclozolin on cell division and its effectiveness in the production of chromosomal aberrations but not sister chromatid exchanges. *Cytobios.* 38:149-158.

Fiskejö, G. 1981. Root tips of *Vicia faba* for their study of induction of chromosomal aberrations. *Mut. Res.* 31:401-412.

Fredrickson, D.S. 1971. An international classification of hyperlipidemias and hyperlipoproteinas. *Ann. Intern. Med.* 75:471.

García-Nieto, R. M., R. López-Revilla, F. Díaz-Barriga, R. Cano-Mancera y S. Arias-Negrete. 1986. *Biología Celular.* pp. 113 y 116. Alhambra Mexicana [ed.],
1ª Edición. México.

Garduño, L., M. Salazar y G. Chamorro. 1992. Estudio sobre el efecto hepatotóxico de la alfa-asarona en rata. Resúmenes del IV Congreso Nacional de Mutagénesis. Carcinogénesis y Teratogénesis Ambiental; Mazatlán: Asociación Mexicana de Mutagénesis. Carcinogénesis, Teratogénesis, Nov. pp.15-18.

Garduño, L., M. Salazar, S. Salazar, M. E. Morelos, F. Labarrios, J. Tamariz and G. Chamorro. 1997. Hypolipidemic activity of alpha – asarone in mice. *J. Ethopharmacol.* 55:161-163.

Gómez, C., G. Chamorro, M. Chávez, G. Martínez et M. Salazar. 1987. Pagés N. Effect de l'hypercholesterolemie et la cholelithiasis experimentale. *Plantes Med. Phytother.* 21:279-84.

Grant, F.W. 1982. Chromosome aberration assays in *Allium*. *Mut. Res.* 99:273-291.

Guerrero, H.G. 1998. Estudio genotóxico de tres nuevos agentes antiepilépticos. Tesis de Licenciatura, Facultad de Biología, Campus Zaragoza, Universidad Autónoma de México.

Guyton, C.A. 1992. Tratado de Fisiología Médica. pp.1032-1033. Interamericana [ed.], 8ª. Edición. México, D.F.

Hanzen, M.J. and M. G. Gutiérrez-González. 1988. UV-mediated toxic bioactivity of harmine in the meristematic cells of *Allium cepa*. *Mutagen*. 3(4):333-336.

Heddle, J.A., C.B. Iue, E.F. Saunders and R.A. Bens. 1978. Sensitivity of five mutagens in Fanconi's anemia as measured by the micronucleus test. *Cancer Res*. 38:2983-2988.

Hernández, A. y E. Zorrila. 1969. Determinaciones simplificadas de lípidos para la clasificación clínica de las hiperlipidemias. *Rev. Med. Hosp*. 18:95.

Hernández, A., M. L. López, G. Chamorro and T. Mendoza-Figueroa. 1993. Alpha-asarone inhibits lipid synthesis and secretion by long-term cultures of adult rat hepatocytes. *Plant. Medica*. 59:121-124.

Hernández-Magaña, R. y M. Gally-Jorda. 1991. Plantas medicinales. pp.72-75. *Árbol* [ed.], 1ª. Edición. México.

Jiménez, L., G. Chamorro et M. Salazar. 1984. Pagés N. Evaluation tératologique de l'alpha-asarone chez le rat. *Ann Pharmaceut Franc*. 46:179-183.

Kihlman, B.A. 1966. *Actions of chemicals on dividing cells*: Prentice-Hall, Englewood Cliffs, N.J. pp. 260.

Kihlman, B.A. 1971. Root tips for studying the effect of chemicals on chromosomes. A. Hollaender (Ed) *Chemical Mutagen*. 2:489-514.

Kolbye, A.C., M. Brooks and J D. Reeves. 1983. Food legislation and testigo of carcinogens in food. *Environmental aspects of cancer. The role of macro and micro components of foods*. Food and Nutrition Press Inc. Westport Connecticut, USA.. pp.238-248.

Labarrios, F., L. Garduño, M. R. Vidal, R. García, M. Salazar, L. Martínez, F. Díaz, G. Chamorro and J. Tamariz. 1999. Synthesis and hypolipidaemic evolution of a series of alpha – asarone analogies related to clofibrate in mice. *J. Pharm. Pharmacol.* 51: 1-7.

Ledenbor, L.V. and W. Schmid. 1973. The micronucleus test. *Methodological Aspects. Mut. Res.* 19:109-117.

Lees, R.S. and D. S. Fredrickson. 1965. Carbohydrate induction of hyperlipemia in normal man. *Clin. Res.* 13:327.

Lehninger, A.L., D. L. Nelson y M. M. Cox. 1995. *Principios de Bioquímica.* pp. 679-680. Omega [ed.], 2ª. Edición. Barcelona.

Lerdo de Tejada, A., J. Sánchez-Reséndiz, J. Puentes-Juárez, E. S. Lerdo de Tejada, J. González-Vite y S. Karchmer. 1980. Modificación de la glucemia en perros, con *Gutteria guameri*. *Med. Trad. Méx.* 3:26-27.

Livingston, K., K. Gordon, L. Byron and E. James. 1990. Induction of nuclear aberrations by smokless tobacco in epithelial cells of human oral mucous. *Environ. Molec. Mutagen.* 15:136-144.

López, M.L., A. Hernández, G. Chamorro and T. Mendoza-Figueroa. 1993. Alpha-asarone toxicity in long-term cultures of adult rat hepatocytes. *Plant Medica.* 59:115-120.

Ma, T.H., A. H. Sparrow, A. L. Schairer and A. F. Nauman. 1978. Effect of 1,2-dibromoethane (DBE) on meiotic chromosomes of *Tradescantia*. *Mut. Res.* 59:251-258.

Ma, T.H., H. Tsungei, D. Jialung, Z. Chen, J. Lin and J. Dai. 1981. Extraordinary high micronucleus frequency induced by X-rays in a special *T. reflexa*. Elsevier Biomedical Press, Environ. Mutagen. Soc. San Diego, C.A.

Ma, T.H. 1983. *Tradescantia* Micronuclei (Trad-MCN). Test for environmental clastogens. In vitro toxicity testing of environmental agents, P.C. A. Ed. Kolber, Wong, Grant, Deunoskin and Hughes-Plenum Publishing Corporation. pp.191-214.

Ma, T.H., M. Harris, V. Anderson, J. Ahmed, D. Mohammad and L. J. Bare. 1984. *Tradescantia*-micronucleus (TRAD-MCN) test on 140 Health related agents Mut. Res. 138:157-167.

Ma, T.H., C. Xu, S. Liao, H. McConnell, B. S. Jeong and C. D. Won. 1996. In situ monitoring with the *Tradescantia* bioassays on the genotoxicity of gaseous emissions from a closed landfill site and an incinerator. Mut. Res. 359:39-52.

Mandoki, J.J., C. Krumm-Heller, J. Vega-Noverola, C. Wong-Ramírez, C. Arriaga y R. Roa. 1980. Aislamiento de la asarona de la corteza de *Guatteria gaumeri* (elemuy) y el estudio de su acción hipocolesterolemizante. Resúmenes del IV Congreso Nacional de Farmacología; Mérida: Asociación Mexicana de Farmacología. pp.18-20.

Martínez, M. 1992. Las plantas medicinales de México. pp.57-58. Botas. [ed.], 6ª Edición. México.

Martínez, C.R. y R. Velázquez. 1995. Identificación, cuantificación y su posible efecto genotóxico de colorantes sintéticos presentes en refrescos de mayor venta en la ciudad de Querétaro. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias Químicas. Universidad Autónoma de Querétaro.

Mohar-Betancourt, O., C. Espinoza-Aguirre, C. Cortinas de Nava y G. Chamorro. 1986. Determinación de la actividad mutagénica de la alfa-asarona en el sistema *Salmonella typhimurium*/microsomas. Resúmenes del 1er. Congreso de Mutagénesis, Carcinogénesis y Teratogénesis; México, Asociación Mexicana de Mutagénesis, Carcinogénesis y Teratogénesis Ambiental. pp.3-5.

Morales-Ramírez, P., E. Madrigal-Bujaidar, J. Mercader-Martínez, M. Cassani, G. González and G. Chamorro-Cevallos. 1992. Sisterchromatid exchange induction produced by *in vivo* and *in vitro* exposure to alpha-asarone. Mut. Res. 279:269-273.

National Institute for Occupational Safety and Health USA. Registry of toxic effects of chemical substances s.l.p. 1977. 2: 166.

Nicoloff, H. and K. Gecheff. 1976. Methods of scoring induced chromosome structural changes in barley. Mut. Res. 34:233-244.

Parker, F., J.D. Bagdole, G.F. Odland and E.L.Bierman. 1970. Evidence of the chylomicron origin of lipids accumulating in diabetic eruptive xantomas: a correlative lipid biochemical and electron microscopic study. J. Cli. Invest. 49:2172.

Pearson, S., S. Stern and H. T. McGavack. 1953. A rapid accurate method for the determination of total cholesterol in serum. Anal. Chem. 25:81.

Ramanna, N.S. and A. T. Natarajan. 1966. Chromosome breakage induced by alkyl-alkane-sulfanates under different physical treatment conditions. Chromosoma. 18:44-59.

Read, J. 1959. Radiation biology of *Vicia faba* in relation to the general problem. Blackwell, Oxford. 74:166-169.

Ren, L., J. Yang and H. Zhang. 1991. Use of the cytokinesis-block micronucleus method in mouse splenocytes. *Mut. Res.* 262:119-124.

Rodríguez, M.E. 1992. Detección de la actividad mutagénica por aguas residuales. Estudio comparativo con dos sistemas biológicos de prueba *Tradescantia* clon 4430 y *Allium cepa*. Tesis de Licenciatura, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de Querétaro.

Ruíz-Flores, E., M.E. Valtierra, S. Lecona, A. Pérez and T.H. Ma. 1992. *Tradescantia*-micronucleus (TRAD-MCN) bioassay on clastogenicity of wastewater and in situ monitoring. *Mut. Res.* 270:45-51.

Salazar, M., S. Salazar, V. Ulloa et T. Mendoza. 1992. Pagés N. Action tératogene del l'alpha-asarone chez la souris. *J. Tox Clin Exper.* 12:149-154.

Sandhu, S.S., V. A. Kasica, M. D. Waters and K. E. Mortelmans. 1981. Mutagenicity of Diallate y Triallate herbicides in a battery of short term test. *Environ. Mutagen.* 3:361-365.

Sánchez-Reséndiz, J. y M. A. Lerdo de Tejada. 1980. Acción hipolipemiente de *Guatteria gaumeri* en un paciente con hiperlipidemia tipo IIb. *Med Trad. Mex.* 3:22-24.

Sánchez-Reséndiz, J., A. Lerdo de Tejada, J. González, R. Guzmán, A. Tinoco, y S. Karchmer. 1980. Acción hipocolesterolemia de *Guatteria gaumeri*. *Med. Trad. Méx.* 9:20-22.

Sánchez-Reséndiz, J., M. Espinoza, H. Delangel, J. González-Vite, L. Gutiérrez y M. A. Lerdo de Tejada. 1985. Modificaciones del colesterol de las lipoproteínas séricas con *Guatteria gaumeri*. *Arch Invest. Med (Mex).* 16: 359-364.

Sánchez-Viesca, F. 1966. Síntesis y espectroscopía de nuevos derivados del asaraldehído. *Ciencia (Mex)*. 26:113-120.

Schmid, W. 1976. The micronucleus test. Handbook of mutagenicity test. Nichols y Ramen eds. Elsevier Scientific Publishing Company. U.S.A. pp.235-242.

Serrano-Cárdenas, V. 1991. Herbario queretano no. 1. Universidad Autónoma de Querétaro. Serie científica. Consejo de ciencia y tecnología del Estado de Querétaro. pp.11.

Seshadri, T.R. and T. R. Thiruvengadam. 1950. A new synthesis of asarone. *Proc Ind Acad Sci*. 32:110-113.

Sharma, J.D. and P.C. Dandiya. 1962. Studies on *Acorus calamus*. Pharmacological actions of alpha and beta-asarone on cardiovascular system and smooth muscles. *Med. Res*. 50:61-65.

Sharma, A.K. and A. Sharma. 1980. Chromosome techniques, theory and practice. 3^a Edition. pp.119-121.

Sosa, M. y A. Covarrubias. 1994. Evaluación del efecto genotóxico inducido por insecticidas piretroides utilizando el sistema biológico de prueba: *Allium cepa*. Tesis de licenciatura. Universidad Veracruzana, Facultad de Ciencias Químicas, Orizaba, Ver.

Sparrow, A.H., A. G. Underbrink and H. H. Rossi. 1972. Mutation induced in *Tradescantia* by small doses of X-rays and neutron: Analysis of dose-response curve of X-rays and neutrons. *Science*. 176:916-918.

Stansfield, D.W. 1993. Genética. pp. 362-436. McGrawHill [ed.], 4ª Edición. México, D.F.

Taylor, J.H. 1950. The duration of differentiation in excised anthers. Amer. J., Bot. 37:137:143.

Trosko, J.E. and Ch. Chang. 1978. Relationship between mutagenesis and carcinogenesis. Photochem. Photobiol. 28:157.

Valadaud-Varrieu, D. 1983. Un'test d'induction de micronayau' sur *Allium sativum*; differentiation de substances clastogenes et mitoclasiques. Mut. Res. 119: 55-58.

Valtierra, M. E. y E. Ruíz-Flores. 1987. Estudio comparativo de la sensibilidad de *Vicia faba* y *Allium cepa* como una alternativa para detectar actividad mutagénica de aguas residuales. Informe. CEACA-Universidad Autónoma de Querétaro.

Vega, S. 1985. Evaluación del riesgo en la exposición a sustancias químicas. En: Evaluación epidemiológica de riesgos causados por agentes químicos ambientales. Toxicología VI OPS/OMS. México, D.F. pp.2-17.

Yuco-Yabiku, H. 1980. Oleo de cálamu: aspectos toxicológicos e seu role em bebidas alcohólicas. Tesis de Maestría en Ciencias de los Alimentos Facultad de Ciencias Farmacéuticas da Universidad de Sao Paulo, Brasil.

Zar, J.H. 1984. Biostatistical Analysis. pp.586-588. Prentice-Hall [ed.], 2ª Edición. U.S.A.