



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO

INSTITUTO DE CIENCIAS BÁSICAS E INGENIERÍA

ÁREA ACADÉMICA DE BIOLOGÍA

LICENCIATURA EN BIOLOGÍA

TÍTULO:

**“EVALUACIÓN DE LOS EFECTOS TÓXICOS Y GENOTÓXICOS
DE EXTRACTOS METANÓLICOS DE MACROMYCETES, CON
BASE EN ESTUDIOS ETNOMICOLÓGICOS DEL ESTADO DE
HIDALGO”**

**TESIS QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
LICENCIADO EN BIOLOGÍA PRESENTA:**

MARISOL MUÑOZ DOMÍNGUEZ

ASESOR:

DR. JUAN CARLOS GAYTÁN OYARZÚN

PACHUCA DE SOTO, HIDALGO 2007.

AGRADECIMIENTOS

A DIOS

Por el don precioso de la vida y por permitirme disfrutar de ella

A MI MAMA

Por tanto amor, apoyo y comprensión, por todos desvelos y angustias que pasaste por mi

A SOFIA Y EDUARDO

Por que sin su apoyo no lo hubiera podido lograr. Gracias por todo el amor, por sus consejos, por soportarme, por su comprensión y sobretodo por ser mis mejores amigos

A NICOLAS Y PATRICIA

Por estar con migo y apoyarme siempre

A ALMA ROSA

Por preocuparte por lo que para mi era importante

A MARCOS Y CRISTINA

Por estar tan cerca de mi e impulsarme a seguir

A ALEJANDRO Y ANGELA

Por estar dispuestos a darme su mano

A FERNANDO

Por que aun con tu silencio y seriedad sabia que estabas ahí,
Siempre dispuesto a apoyarme

A MIS SOBRINOS

Por el amor que me han profesado en los momentos buenos y en aquellos que no lo han sido tanto

AL P. RODRIGO LOPEZ PEREZ

Por ser la presencia de dios mismo y por darme tanto amor

A TODOS USTEDES, GRACIAS, POR QUE FORMAN UNA PARTE MUY IMPORTANTEN DE MI VIDA Y SIN USTEDES NO LO HABRIA LOGRADO

A MIS AMIGAS (PILAR, JESSICA, EDITH Y PATY)

Por todos los momentos que pasamos juntas, por el apoyo y por que me enseñaron que todavía se puede encontrar la amistad sincera

A MIS AMIGOS

Por los minutos felices que pasamos y las buenas platicas que tuvimos

A MIS COMPAÑEROS

Por todo lo que pasamos dentro del aula y en esas practicas inolvidables

AL DR. JUAN CARLOS GAYTAN

Por que dentro de la carrera fuiste la pelea que me impulso a seguir

A MIS SINODALES

Por que tomaron un poquito de su tiempo para ayudarme a concluir este proyecto

A MIS MAESTROS

Por compartir sus conocimientos con migo.

**Y GRACIAS A TODOS AQUELLOS QUE PARTICIPARON DE UNA FORMA U
OTRA PARA CONCLUIR ESTE SUEÑO**

DEDICATORIA

A IRENE DOMINGUEZ LEYVA

A la persona que mas admiro en este mundo, por que tu me enseñaste que con esfuerzo, dedicación, paciencia, humildad y sobre todo amor se pueden lograr todas las cosas que uno quiere

Que aunque el mundo se nos caiga encima, siempre se puede tener una sonrisa para los de mas, que al mal tiempo, buena cara. Que pase lo que pase, lo importante es tener una gran familia unida y con mucho amor.

A ti que superaste los peores momentos y que no importo todo lo malo, tu te levantaste y seguiste por todos nosotros.

A ti que me enseñaste y me diste lo bueno.

Un millón de gracias!!!

TE AMO, MAMA.

LA BASE DE TODO LO QUE SOY, A MI FAMILIA. ESTE ESFUERZO ES PARA USTEDES Y POR USTEDES.

ÍNDICE

Contenido	Páginas
RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	2
1. ANTECEDENTES	3
1.1 Etnobiología y etnomicología	3
1.2 Los macromycetes	6
1.3 Micetismos	15
1.4 Toxicología genética	19
1.5 Bioindicadores, bioensayos y biomarcadores	22
1.6 <i>Drosophila melanogaster</i> como bioensayo	24
1.7 Prueba de Mutación y Recombinación Somática (SMART)	26
1.8 El ojo de <i>Drosophila melanogaster</i>	29
2. OBJETIVOS	31
2.1 Objetivo general	31
2.2 Objetivos particulares	31
3. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL	32
3.1 Trabajo de campo, colecta y almacenamiento	32
3.1.1 Elección del área de estudio y selección de macromycetes	32
3.1.2 Recolección de muestras	32
3.2 Trabajo de laboratorio	33
3.2.1 Obtención de extractos	33
3.3. Evaluación de toxicidad	35
3.4. Evaluación de genotoxicidad	36
3.4.1 Curvas de toxicidad.	37
3.4.2 Prueba de Mutación y Recombinación Somática (SMART) en ojos de <i>Drosophila melanogaster</i> .	38
3.4.3 Tratamiento Agudo	40
3.4.4 Análisis microscópico de ojos	42
3.4.5 Pruebas estadísticas	43
4. RESULTADOS	47
4.1. Estudios etnomicológicos	47
4.2. Obtención de extractos	47
4.3. Pruebas de toxicidad	48
4.4. Genotoxicidad	50
5. DISCUSIÓN	61
6. CONCLUSIONES	66
7. LITERATURA CITADA	69

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

Figura No.	Contenido	Página
1	Morfología de algunos Basidiomycetes	8
2	Morfología de los Boletaceos	11
3	<i>Boletus satanoides</i>	13
4	<i>Tylopilus felleus</i>	15
5	Ciclo de vida de <i>Drosophila melanogaster</i>	25
6	Macho y hembra de <i>Drosophila melanogaster</i>	26
7	Discos imagales en <i>Drosophila melanogaster</i>	27
8	Manchas en ala	28
9	Manchas en ojos	28
10	Estructura de una omatidia	30
11	Destilación por reflujo	34
12	Obtención de extractos puros	35
13	Línea White (w) y Cantón- S (w+)	39
14	Cronograma del procedimiento experimental	46
15	Manchas en ojos de <i>Drosophila melanogaster</i> inducidas con <i>Boletus satanoides</i> y <i>Tylopilus felleus</i> .	56
16	Manchas en ojos de <i>Drosophila melanogaster</i> inducidas con MMS y sacarosa al 5%	58
17	Número/tamaño de clones por tratamiento (Gráfica)	60

Tabla No.

I	Diluciones utilizadas para obtener la CL50	37
II	Cruza progenitora en <i>Drosophila melanogaster</i> para la prueba de SMART en ojos	41
III	Tabla de rendimiento para la obtención de extractos metanólicos	48
IV	Valores promedio \pm desviación estándar y porcentaje de mortalidad de <i>Drosophila melanogaster</i> con dos extractos de hongos, de dos replicas	49
V	Valores promedio \pm desviación estándar y porcentaje de mortalidad de <i>Drosophila melanogaster</i> con MMS, de dos replicas	51
VI	Número y frecuencia de manchas/ojo obtenidas en cada tratamiento	52
VII	Resultados y diagnóstico de la prueba de X2 con <i>Boletus satanoides</i> comparados con sacarosa	53
VIII	Resultados y diagnóstico de la prueba de X2 con <i>Tylopilus felleus</i> comparados con sacarosa	55
IX	Resultados y diagnóstico de la prueba de X2 con MMS comparados con sacarosa	59
Cuadro I	Principales micetismos producidos por macromycetes	16
Anexo 1		68

RESUMEN

México cuenta con una gran diversidad biológica, y de manera particular el estado de Hidalgo, posee una gran variedad de recursos naturales, dentro los cuales destacan los hongos; y por ende, cuenta con un gran conocimiento etnomicológico, debido a que existen en el estado varias etnias, que los han usado tradicionalmente, jugando un papel importante en su desarrollo social y cultural (Villaseñor, 1998 y Ruiz *et al.*, 1999).

El objetivo del presente trabajo fué evaluar los efectos tóxicos y genotóxicos, de los extractos metanólicos de macromycetes, con base en estudios etnomicológicos relacionados con su toxicidad de los municipios de Mineral del Chico y Zacualtipán, Hidalgo.

Para ello, se realizaron pruebas de toxicidad en ratas (*Rattus norvegicus*) y en insectos (*Drosophila melanogaster*), así como pruebas de genotoxicidad a través de la Prueba de Mutación y Recombinación Somática (SMART) en ojo; con tratamientos agudos (6 horas) en larvas heterocigas de locus white (w / w^+), que se expusieron a una concentración de 5:1 (agua:extracto metanólico); al igual que con un mutágeno positivo o de referencia (MMS) y un control negativo (sacarosa al 5%), evaluándose el efecto genotóxicos en moscas adultas, registrándose el número y tipo de clones celulares inducidos en ojos.

Los resultados obtenidos permiten demostrar un efecto no tóxico a la concentración probada en ratas, mientras que en *Drosophila* existió un efecto tóxico para ambas especies de hongos; en cuanto a la genotoxicidad, se detectó un resultado positivo para *Boletus satanoides* con un efecto directo e indirecto, mientras que *Tylopilus felleus* sólo resultó positivo como agente mutagénico indirecto.

INTRODUCCIÓN

Los recursos naturales han tenido un papel muy importante en la vida del hombre, sin embargo; uno de los recursos de mayor importancia han sido sin duda, los hongos; debido a que las diversas etnias o culturas indígenas, los han utilizado tradicionalmente como recurso alimenticio, con fines medicinales, ornamentales, cosméticos, ceremoniales, así como insecticidas y combustible (Ruiz *et al.*, 1999).

En la actualidad se conoce que los hongos presentan tanto efectos benéficos como deletéreos, e incluso efectos letales. Todo esto se debe a las toxinas que presentan que pueden producir micetismos (intoxicación o envenenamiento causado por las toxinas de macromicetos) y que están enfocados a medir los efectos fisiológicos que presentan los individuos que consumen este tipo de hongos (Pérez-Silva y Herrera, 1991).

A pesar de conocer sus efectos benéficos, poco se sabe acerca de la toxicidad de los hongos y menos del efecto genotóxico de algunas especies. Se han realizado diversos estudios toxicológicos, principalmente de hongos considerados como peligrosos, así como también estudios antimutagénicos de ciertas especies muy conocidas, pero son pocos los estudios acerca del efecto mutagénico que presentan.

El presente trabajo, demuestra el efecto mutagénico que presentan algunas especies de hongos que se encuentran en algunas regiones del estado de Hidalgo, con el fin de contribuir y ampliar la limitada información relacionada con este tema.

1. ANTECEDENTES

1.1 Etnobiología y etnomicología

México cuenta con una gran diversidad biológica; en la mayoría de sus estados y de manera particular el estado de Hidalgo, es importante por su riqueza en recursos naturales y cultura (Grupos nahuas, otomí y Tepehua que habitan la región), en donde, la riqueza biológica (variedad de ecosistemas y genética) representan una gran importancia en el desarrollo socioeconómico del estado (Gaytán *et al.*, 2004).

La gran riqueza biológica que presenta el estado de Hidalgo, está asociada a la amplia gama de factores climáticos y geográficos, que van desde el cálido húmedo hasta el seco, en donde las comunidades vegetales se adecuan a estas condiciones cambiantes; encontrando en el estado matorrales desérticos, matorrales submontanos, selva mediana subperenifolia, bosques caducifolios y de pino-encino, selvas altas perennifolias y a mayor altitud los bosques de niebla (Romero, 1996) y por lo tanto la fauna y en especial los hongos también presentan una gran diversidad.

Se ha demostrado en términos generales, que los sitios donde habitan los grupos indígenas están altamente relacionados con las regiones que albergan una gran biodiversidad, y dentro de ésta, se encuentra el reino de los hongos; el cual cuenta con una riqueza de aproximadamente 110 mil especies de hongos identificados hasta la fecha de importancia ecológica, económica y social (Villaseñor, 1998). Dentro de las cuales se encuentran especies comestibles,

tóxicas, alucinógenas, medicinales, de ornato e incluso especies consideradas como mortales.

El estado de Hidalgo también se caracteriza por tener una amplia tradición micófaga (consumidora de hongos); ocupa el tercer lugar a nivel nacional en cuanto a número de especies que se consumen con aproximadamente 126 de ellas (Romero, 1996).

Actualmente el conocimiento de los hongos sobre sus propiedades alimenticias, ornamentales y medicinales es muy extenso, y esto se debe a su uso ancestral; ya que diversas etnias que estén en contacto con ellos, los han utilizado como medio fundamental para su existencia, de igual manera su uso está muy vinculado a su tradición cultural y ritual, por sus cualidades alucinógenas o enteógenas (estar más cerca de Dios) (Moreno-Fuentes *et al.*, 2001).

De las ricas tradiciones se deriva que el uso de los hongos sea muy extenso; ya que no sólo constituyen un recurso alimenticio, sino que también son utilizados con diversos fines. Históricamente los hongos le han otorgado al hombre muchos beneficios, que han evolucionado junto con el avance tecnológico del hombre; como la producción de antibióticos, controladores biológicos de plagas, coadyuvantes en la producción agrícola, fermentadores de bebidas y como ingredientes principales en la industria alimenticia y farmacéutica (Ruiz *et al.*, 1999). Sin embargo algunos hongos, tienen efectos perjudiciales, como la destrucción de materiales, contaminación de cultivos y alimentos, parasitando plantas, animales y el hombre mismo, así como producción de toxinas e intoxicaciones que pueden causar la muerte, por lo que su

conocimiento también implica un área importante de investigación para su regularización (Villaseñor, 1998).

Esta comprensión se puede englobar en la etnobiología, que es una disciplina híbrida del conocimiento, en la cual se encuentran diversas ramas que también incluyen el saber propio de cada persona, como la etnozología, la etnobotánica y la etnomicología (Moreno-Fuentes *et al.*, 2001). El significado de etnomicología, ha sido de mucho debate entre numerosos autores que han intentado dar una definición, por lo tanto se pueden encontrar diversas definiciones; una de ellas y que es el concepto original de la etnomicología, fue propuesto por Wasson en 1993; donde menciona que es “el estudio del papel desempeñado por los hongos mágicos en la historia de las sociedades primitivas”, sin embargo, este es uno de los conceptos más sencillos, detrás de este se han desarrollado varios más, como el que propusieron Estrada-Torres, 1989 en Moreno-Fuentes *et al.*, 2001, en donde dice que la etnomicología es “un área de la etnología interesada en el estudio de las interrelaciones del hombre con los hongos que se desarrollan en su entorno, haciendo referencia a la influencia que estos organismos han tenido en las expresiones culturales del hombre, a través del tiempo y en diferentes regiones geográficas”. Por último un concepto más y muy parecido al anterior, es el que dice que la etnomicología es “un área de la etnobiología que se encarga de estudiar el saber tradicional y las manifestaciones e implicaciones culturales y/o ambientales que se derivan de las relaciones establecidas entre los hongos y el hombre a través del tiempo y del espacio” (Moreno-Fuentes *et al.*, 2001).

La etnobiología y en especial la etnomicología tiene profundas raíces, debido a las ricas tradiciones que hay desde hace más de 500 años (Moreno-Fuentes *et al.*, 2001).

1.2 Los macromycetes

Los hongos son organismos eucarióticos, heterótrofos, usualmente filamentosos y multicelulares; su núcleo es pequeño aunque se puede observar con facilidad y se nutren por absorción. Sus estructuras somáticas filamentosas denominadas hifas, están rodeadas por una pared celular formada en muchos casos por celulosa o quitina, al conjunto de éstas se le denomina micelio, a través del cual se da el crecimiento apical. Las estructuras reproductivas presentan una variedad de formas y son fácilmente distinguibles de las estructuras somáticas (Alexopoulos *et al.*, 1996).

Los hongos se reproducen tanto sexual como asexualmente, pero en cualquiera de los dos casos forman esporas como producto final. Las esporas difieren en tamaño y forma, pero se diferencian de las semillas de las plantas porque no contienen un embrión preformado (Deacon, 1988).

El reino de los hongos es extraordinariamente diverso, el cual podemos dividir en dos grandes grupos; micromicetos y los macromicetos. Los primeros son microscópicos unicelulares, suelen medir menos de 1 mm. Estos se reproducen en una fase asexual de su ciclo de vida denominada imperfecta, donde son liberados los conidios o esporas asexuales desde zonas especializadas del micelio. Las levaduras, royas y tizones pertenecen a este grupo (Díaz-Barriga, 1995).

Los macromycetes son hongos macroscópicos pluricelulares, son los cuerpos fructíferos del micelio, es decir la parte que aparece sobre la tierra entre la hojarasca, madera, estiércol o insectos y que la gente conoce como hongos. Contiene la unidad reproductiva que son las esporas y por debajo de la tierra esta la parte vegetativa que es el micelio, que es en forma de una capa filamentosa de color blanco y la que se encarga de extraer los nutrientes del sustrato (Díaz–Barriga, 1995).

De manera particular, dentro de los macromycetes, podemos encontrar a la familia Boletaceae, que pertenecen al orden de los Boletales, Subclase Agaricomycetidae, Clase Basidiomycetes, Phylum Basidiomycota y en el reino Fungi (Hawksworth, 2001).

La clase Basidiomycetes, son un grupo de hongos donde las esporas se forman sobre una célula especializada denominada basidio, que es de forma clavada, en su parte terminal se encuentran estructuras en forma de pequeños cuernos denominados esterigmas es ahí, donde se producen las esporas, que pueden ser de 2 a 4 y son fuertemente dispersadas. La mayoría de éstos hongos, producen un micelio septado bien desarrollado, el cual puede ser simple o doliporo, dependiendo del orden taxonómico al que pertenezcan, presentan una infinidad de formas, colores, ornamentaciones y el aspecto típico de un hongo de este grupo es aquel que presenta un sombrero con láminas y un pie definido, aunque también se encuentran hongos que presentan poros, dientes, tubos o venas en el himenio (Alexopoulos *et al.*, 1996).

Los Basidiomycetes tienen una amplia distribución e incluyen a las setas, tecomates, agritos, a los pedos de burro, entre muchos otros (Díaz–Barriga, 1995) (Fig. 1).



Figura 1. Morfología de algunos Basidiomycetes

(Houdou, 2001)

Dentro de la clase de los Basidiomycetes se encuentra la familia Boletaceae, que puede distinguirse fácilmente de otras familias dentro de los Agaricales por ciertas características microscópicas y macroscópicas como son; el color de las esporas, el arreglo de los poros, la naturaleza de la cutícula del estrato externo del pileo y el color de varias porciones del basidiocarpo (Snell y Dick, 1970).

A primera vista el basidiocarpo de la familia Boletaceae puede parecerse al de los típicos hongos, pero una diferencia significativa es el cojinete de la parte de abajo del pileo. Generalmente, este grupo de hongos son de conformación robusta, poseen tubos arraigados verticalmente al interior del himenio, los cuales pueden ser separados con facilidad de la parte interior del píleo, que desemboca en poros visibles, de forma, tamaño y color característicos según la especie y que se encuentran debajo de la superficie y se hallan abiertos. El basidio y varios elementos estériles comprenden la línea del himenio dentro de cada tubo (Alexopoulos *et al.*, 1996).

El estípite es otra de las características importantes, éste es cilíndrico o subcilíndrico, atenuado o denso hacia la base, ventricoso o bulboso, liso o glabroso; puede presentar un hueco en etapa adulta (Snell y Dick, 1970).

Otras de las características que presentan los Boletaceos es que la superficie del pileo es viscosa o seca, puede ser también escamosa, tomentosa, fibrosa, granulosa o glabrosa. Tienen un himenóforo tubulado, decurrente o adnado alrededor del estípite o libre; la parte más fácilmente separable es blanca o con varios tonos de amarillos o en ocasiones rojizos o en muchos casos verdosos u oliváceos o marrones (Snell y Dick, 1970).

Los poros son muy pequeños y cerrados en los organismos jóvenes, pero muy anchos y abiertos en la etapa adulta. Pueden observarse de color gris, rojo, amarillos, marrón o algunas veces rosas. El color de las esporas es oliváceo, cimarrón, ocráceo o vináceo, rosa o verde limón, al microscopio usualmente no tienen un color fuerte, son frecuentemente palo de rosa, melón, marrón, amarillentas o hialinas (Snell y Dick, 1970).

Otra particularidad, es el cambio de coloración en diversas partes del basidioma, que puede ser azul, verde, rosa o rojizo, dicha coloración se da cuando el himenio, contexto u otra parte del basidioma es manipulado y expuesto al ambiente, en ocasiones este cambio de color es muy drástico, aunque en algunas especies no sucede; siendo importante en la identificación de muchos boletaceos. Dentro de esta familia, las especies venenosas son reconocidas fácilmente debido que al dañarse pueden presentar tres opciones de coloración, ya sea azul, poros rojos o ambos (Fig. 2). La mayoría de los pigmentos encontrados en esta familia provienen del ácido pulvínico los cuales pueden ser característicos para su identificación taxonómica (Alexopoulos *et al.*, 1996 y García-Jiménez *et al.*, 1998).

Los hongos que componen esta familia son conocidos comúnmente entre las diversas poblaciones con diferentes nombres y su importancia comestible es muy grande, por lo que es muy fácil encontrarlos en mayor cantidad con las “hongueras”. (Rodríguez *et al.*, 2003).



Figura 2. Morfología de los Boletaceos (Houdou, 2001).

Muchas especies de los boletaceos son comestibles, algunos otros son amargos y algunas de las especies pueden ser tóxicas o venenosas como; *Boletus satanoides* y *Tylopilus felleus*, que son las especies que se estudiaron en este trabajo.

Boletus satanoides Smotl. 1920 (Singer, 1966), se le conoce también como *B. splendidus* ssp. *Splendidus*, su nombre común es “hongo bayo”; en la región de Mineral del Chico, Hgo. Presenta un píleo de 70 a 130 mm de diámetro, convexo, superficie seca, lisa, ligeramente agrietada al centro, de color blanquecino a café grisáceo o café oliva, con el margen ligeramente apendiculado. El himenóforo adherido o subdepreso; tubos de 10 a 15 mm de largo, amarillos, se manchan

ligeramente de azul al exponerse al ambiente, poros de 0.3 a 0.7 mm de diámetro, redondos, de color rojo sangre a naranja rojizo, se manchan de azul al tocarse. Su estípite es de 55 a 100 X 40 a 55 mm, cilíndrico a bulboso, de color amarillo pálido o amarillo anaranjado a blanquecino, de color rojo vináceo a rojo carmín en el tercio inferior y en partes del ápice, superficie con un retículo de color rojo carmín en toda su extensión. Su contexto es de 10 a 25 mm de grosor, amarillo pálido, blanquecino o ligeramente grisáceo; se mancha ligeramente de azul al exponerse, olor fungoide, sabor dulce a ligeramente aciduloso y el micelio es blanquecino (García, 1999) (Fig. 1).

Crece solitario o subgregario en el mantillo de bosques de *Quercus*, mixtos de *Quercus–Pinus* o bosque mesófilo de montaña, asociándose con especies de *Quercus*; fructifica en julio y agosto. En México se distribuye en algunos estados del centro, como Querétaro, Michoacán, Puebla e Hidalgo. En 1990, se registro por primera vez para estos estados, principalmente para Hidalgo (García, 1999) (Fig. 3).

Esta especie puede ser confundida con *B. satanas*, del cual se distingue por presentar esporas más pequeñas y por la forma del estípite el cual en *B. satanoides* es cilíndrico a bulboso, mientras que en *B. satanas* es marcadamente ventricoso. Se encuentra registrado como un hongo venenoso Díaz–Barriga, 1995 y García, 1999).



Figura 3. *Boletus satanoides* (Kuo, 2001)

Tylopilus felleus, Bulliard 1791 (P. Karst, 1881), se le conoce también como *Boletus felleus* y su nombre común es “Boleto amargo u hongo loco”, en la región del municipio de Zacualtipán, Hgo; donde se recolecto en Bosque de *Fagus grandifolia* var. Mexicana. Presenta un pileo de 8 a 25 cm. de diámetro, algunas veces hasta 40 cms. La superficie es suave y seca, pero muy pegajosa cuando se colecta en la lluvia, variable en el color, usualmente tiene matices de tostado a marrón, a menudo rosáceo o rojizo-violeta cuando es joven, se tiñe de rojizo o marrón oscuro cuando es adulto. El contexto es firme, después es blando y flexible, de color blanco y se tiñe de rosa cuando se expone o se daña. El himenóforo esta adherido o casi libre y presionado, primero de color blanco y en la madurez color rosa por el efecto de las esporas, al tacto pasan a color ferruginoso. Los tubos en su mayor parte simples y a veces compuestos, poros angulares de tamaño medio. El estípite es subequal engrosado en la base, usualmente reticuloso en la parte de arriba y algunas veces

enteramente en la base; pálido o marrón claro, ocasionalmente con tonalidades oliváceas, blanco y en algunos lugares rosado, de 5 a 12 cm de largo X 15 a 25 mm de grosor, pero a veces de 6 a 7 cm en la base. No tiene olor o no es perceptible, sabor indudablemente amargo especialmente cuando es joven y cambia con la edad;

Crece solitario o gregario en mezclas de roble o abeto, pero también en mezclas de píceaseas, abeto de bálsamo, abedul y álamos (Snell y Dick, 1970) y asociado a los bosques de *Fagus grandifolia* var. Mexicana, *Alnus jorullensis*, *Pinus patula*, *Quercus* sp., *Pinus-Quercus*; fructifica en los meses de mayo a noviembre. En el 2007, se registro por primera vez en el estado de Hidalgo (Rodríguez, 2007).

No es comestible por su sabor muy amargo, pero tampoco es tóxico o venenoso, se necesita una cantidad muy grande para que surta algún efecto tóxico (Luciano, 1985) (Fig. 4).

Esta especie es muy similar y se puede confundir con el boletaceo del complejo “*edulis*”, pero se pueden distinguir porque *T. felleus* presenta en la mayoría de su estípite una gran red de tubos y en “*Edules*” la extensión de esta red es variable y a veces sólo se puede observar en la mitad superior del estípite y otra de las diferencias es que en el primero el color de la zona cortical del estípite es de color crema–castaño o también olivácea y en el segundo es de color avellano–ocre, y varia según el caso, pero por lo regular es mucho mas claro que en *T. felleus* (Luciano, 1985).

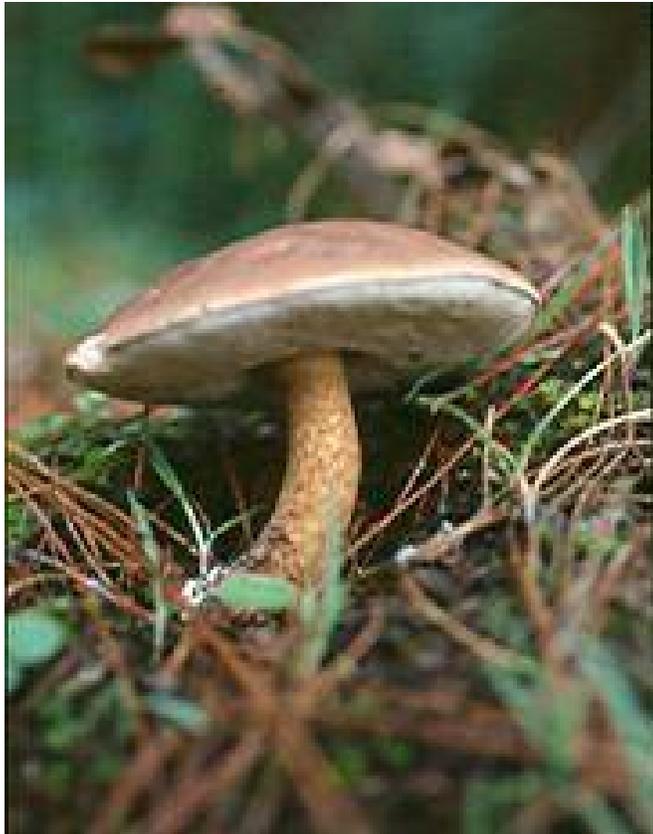


Figura 4. *Tylopilus felleus* (Rodríguez, 2007).

Aparte de estas dos especies existen numerosos hongos de esta familia que presentan un efecto tóxico o venenoso, aunque la línea entre los hongos venenosos y comestibles es muy confusa y poco conocida (Moore – Landecker, 1996).

1.3 Micetismos

La mayoría de los hongos dañinos producen algunos síntomas o efectos nocivos los cuales se agrupan en diversos síndromes conocidos como micetismos (Moore – Landecker, 1996).

Los micetismos son la “intoxicación o envenenamiento causado por la ingestión de macromicetos” que contengan o produzcan sustancias que no pueden ser descompuestas por los procesos digestivos y metabólicos del hombre, que al ser absorbidas, provocan reacciones tóxicas, que causan desde un cuadro diarreico sin complicaciones hasta la muerte por destrucción hepática y/o renal” (Ruiz *et al.*, 1999) (Cuadro I). Los micetismos que se pueden presentar son de 6 tipos principalmente.

Cuadro I. Principales micetismos producidos por macromycetes (modificado de Ruiz *et al.*, 1999).

MICETISMO	CARACTERÍSTICAS
FLOIDIANO O FALOIDIANO	Fase coleriforme: Vómitos, cólicos, diarrea, vértigos, convulsiones, entre otros.
	Fase hepatorenal: Hepatomegalea, ictericia y puede haber muerte; entre otros síntomas.
	Fase neurológica: Trastornos de la conciencia, coma, euforia, parálisis, etc.
PARAFALOIDIANO	Algunos síntomas; sequedad de mucosas, nefritis, somnolencia, convulsiones, entre otros.
MUSCARÍNICO	Síndrome sudoriano: vómitos, cólicos abdominales, diarrea abundante, etc.
	Síndrome panteriniano: Náuseas, vómitos, cólicos, diarreas, confusión mental, estado de coma, entre otros.
GASTROINTESTINAL	Nauseas, vómitos, diarreas, dolor abdominal intenso.
INCONSTANTE O CONDICIONADO	Síndrome giromitriano: ansiedad, vómitos, diarrea sanguinolenta, debilidad, sueño profundo, insuficiencia renal, trastornos respiratorios y coma.
	Síndrome copriniano: Taquicardia, arritmias, congestión, disnea, mareos, náuseas, vómitos, colapso, etc.
CEREBRAL	Cefalea, mialgias, alucinaciones, depresión y angustia, entre otros.

La mayoría de los micetismos se producen de manera accidental, excepto el micetismo cerebral, el cual es provocado voluntariamente al ingerir hongos alucinógenos conciente y adictivamente; también, se presenta por un solo consumo accidental del hongo (Ruiz *et al.*, 1999).

Generalmente los hongos tóxicos de esta familia causan un micetismo conocido como **Síndrome gastrointestinal**, el cual actúa después de periodos cortos de 15 minutos a 2 ó 4 horas después de la ingestión. Los síntomas son náuseas, vómito, diarrea y dolores abdominales, los cuales pueden ser cólicos, así también entumecimiento del intestino. En casos serios, pueden presentarse calambres en los músculos y desordenes circulatorios. Después de uno o dos días los síntomas normalmente desaparecen sin algún otro efecto. Todo esto depende de algunos factores como la susceptibilidad biológica, el estado metabólico, sexo, edad de los individuos, entre otras (Bresinsky y Besl, 1990).

Por otro lado, también se presentan falsas intoxicaciones y envenenamientos producidas por los hongos, las cuales también pueden terminar en la muerte del individuo; estas falsas intoxicaciones se deben al consumo excesivo de cuerpos fructíferos, por predisposición de la persona de que el hongo es venenoso o tóxico, el consumo de algunos hongos en descomposición, en algunas ocasiones el consumo del basidioma crudo, por alergia, por la misma intolerancia de la gente, la combinación de cuerpos fructíferos y alcohol, etc. (Bresinsky y Besl, 1990).

El nivel de toxicidad o la inocuidad de algunas especies de hongos depende de su procedencia geográfica y ecológica y del procedimiento que se siga en su confección culinaria, pues hay diferencias entre las diversas variedades y formas

geográficas y ecológicas, hay algunas especies que sólo son tóxicas cuando se ingieren crudas como sucede con *Amanita muscaria*, que pierden en gran parte su toxicidad y hasta pueden ser ingeridas, sin peligro cuando se les elimina tanto la cutícula del píleo donde están concentradas las toxinas, como el agua donde fueron hervidas dichas hongos, debido a que las toxinas son solubles en agua (Pérez- Silva y Herrera, 1991).

La producción de micotoxinas son las que producen estos efectos adversos, sin embargo; las toxinas que producen la mayoría de los hongos venenosos son poco conocidas o identificadas; solo se conocen las de algunos hongos y en menor cantidad los efectos deletéreos de estas y lo que pueden originar (Moore–Landecker, 1996). Sólo se conocen los efectos nocivos de los hongos alucinógenos o de los hongos de los que ya se tiene una mayor comprensión de los desórdenes que causan. Dentro de los géneros con los que se cuenta información acerca de intoxicaciones mortales, se encuentran: *Amanita*, *Galerita*, *Lepiota*, *Conocybe* y *Cortinarius*. Estos géneros contienen un tipo específico de toxinas que los podemos encontrar en diferentes grupos químicos. El tipo predominante corresponde a los ciclopéptidos azufrados, aunque también hay aminocolinas, disulfúros orgánicos y derivados alcaloides. Todas las toxinas son termoestables y su toxicidad se debe probablemente a los compuestos liberados por la hidrólisis de los glucósidos (Ruiz *et al.*, 1999).

Entre las sustancias químicas más conocidas y encontradas en Boletaceos tóxicos, se encuentran derivados del ácido pulvínico, derivados del diarilciclopentanos, grevilinas y bobiquinonas (Hoiland, 1987).

La mayoría de los hongos no contienen una sola toxina, pueden tener muchas más toxinas activas que causan estos síndromes, aunque varios de los hongos perjudiciales tienen micotoxinas específicas (Moore–Landecker, 1996).

Las micotoxinas son agentes naturales que causan un daño al consumirse en bajas cantidades y en mayor magnitud cuando se consumen en grandes cantidades; los efectos tóxicos que causan varían mucho, van desde un simple vómito en animales de granja hasta un cáncer en humanos. En más de 100 especies de hongos Boletaceos es conocida la respuesta tóxica que causan en condiciones naturales, mientras que en condiciones de laboratorio son pocas las micotoxinas conocidas así como sus efectos (Moore–Landecker, 1996).

La micotoxinas se identifican por medio de pruebas químicas, pero los efectos nocivos que causan sobre los organismos, sólo se pueden conocer con la ayuda de estudios toxicológicos, a través de bioindicadores, bioensayos y biomarcadores.

1.4 Toxicología genética

La toxicología es la rama que se encarga de estudiar las sustancias químicas y los fenómenos físicos en cuanto a su capacidad de producir alteraciones patológicas en los seres vivos, al mismo tiempo estudia los mecanismos de acción y los medios para contrarrestarlas, así como los procedimientos para detectar, identificar y determinar tales agentes y valorar su grado de toxicidad (Vettorazzi, 1992), en otras palabras, estudia los efectos nocivos producidos por agentes químicos o xenobióticos (no son constituyentes propios del organismo, como las micotoxinas), sobre los organismos vivos; establece el uso adecuado y evalúa los

riesgos, estableciendo la magnitud del daño en función de la exposición a estos agentes tóxicos (Vega, 1985a y Fernícola, 1992a).

La toxicología es una ciencia, que recurre a los resultados y metodología de muchas ciencias básicas, como la fisiología, farmacología, el estudio del metabolismo, la genética, química, etiología, embriología y estadística, entre otras (Vogel, 1985). Se divide en diversas áreas del conocimiento de acuerdo al uso que el hombre haga del agente xenobiótico para cumplir con algunas necesidades relacionadas con la vida. Dentro de estas áreas se considera a la Toxicología de alimentos, ambiental, de medicamentos, ocupacional y/o social. También se divide en subespecialidades de acuerdo con las ciencias con las que se conjuguen como la toxicología genética y la ecotoxicología (Fernícola, 1992a).

La toxicología genética es una subespecialidad de la toxicología, que identifica y analiza la acción de los agentes de toxicidad directa hacia los componentes hereditarios de los sistemas vivos. Su principal objetivo es detectar y entender las propiedades de los agentes mutagénicos o genotóxicos, los cuales son específicos para ácidos nucleicos, en particular para el DNA (Vogel, 1985).

Esta área del conocimiento tiene un doble papel, la de implementar pruebas y métodos para evaluar el potencial de riesgo y definir el impacto ambiental de los agentes genotóxicos, la segunda función es identificar las relaciones existentes entre la genotoxicidad y la iniciación de los procesos cancerosos (Vogel, 1985).

Los agentes mutagénicos (genotóxicos) pueden afectar o interactuar directamente con el DNA. Si el mutágeno actúa al momento del contacto con el organismo, se le conoce como agente genotóxico directo, debido a que son utilizados

como macromoléculas y no necesitan ser activados por enzimas; por otro lado, a los mutágenos que actúan poco tiempo después de tener contacto con el organismo se les conoce como agentes indirectos, debido a que su estructura puede ser modificada por enzimas en el metabolismo que juega un papel muy importante, (Vogel, 1985).

Los agentes xenobióticos son clasificados de diferentes formas dependiendo el interés y necesidades de quien realiza la clasificación (Fernícola, 1992a).

Una de las clasificaciones de los agentes tóxicos es con base en la forma de acción y pueden ser:

1. Mutágenos, que actúan de manera directa, si son reactivos por si mismos, es decir, que no necesitan ser activados mediante el metabolismo del organismo expuesto, y reaccionan con macromoléculas (proteínas y el DNA).
2. Promutágenos; que actúan de manera indirecta, es decir, que al no ser genotóxicos por sí mismos, requieren ser activados por las enzimas presentes en los organismos (Muñoz, 1998).

También, se pueden ubicar en tres grupos, dependiendo del estado de desarrollo en el que actúen y lo que causen:

1. Mutagénicos: estos agentes tienen la capacidad de causar cambios en el material genético en el núcleo de las células, de manera que pueden ser transmitidos durante la división celular. Si las células somáticas embrionarias son afectadas y no las células germinales, el individuo presenta únicamente

los efectos. Este es el caso más común, y la mayoría de los defectos congénitos no son hereditarios.

2. Carcinogénicos: estos compuestos tienen la capacidad de inducir la producción de tumores, tanto en exposición aguda como crónica.

3. Teratogénicos: Si la sustancia causa defectos en el desarrollo del feto, después de la concepción hasta su nacimiento. Este efecto se puede manifestar en mayor proporción, cuando la exposición se lleva a cabo dentro del primer trimestre de desarrollo embrionario en el hombre, durante el periodo de organogénesis (Fernícola, 1992b).

Los agentes químicos pueden ser simultáneamente carcinogénicos, mutagénicos y teratogénicos, la gran mayoría de los agentes mutagénicos son carcinógenos y/o teratogénos. (Fernícola, 1992b).

1.5 Bioindicadores, bioensayos y biomarcadores

Para realizar los análisis ya sean toxicológicos o genotóxicos, así como estudiar todo tipo de agentes químicos al mismo tiempo que su efecto, se utilizan organismos llamados indicadores biológicos o bioindicadores, también conocidos como sistemas de prueba (Butterworth, 1995) y de manera más frecuente para diversos estudios de toxicidad se utilizan organismos en condiciones controladas, denominados bioensayos.

Los bioindicadores son organismos que están expuestos en el ambiente de manera natural y los bioensayos, son organismos que en condiciones controladas en

el laboratorio (*in vivo* o *in vitro*), permiten correlacionar el efecto de los agentes físicos y/o químicos a nivel biológico.

Así como se utilizan bioensayos y bioindicadores, también se utilizan biomarcadores que son estructuras o parte de un organismo para detectar la presencia o ausencia del daño; así como la magnitud de éste, por medio de cambios en su expresión, ya sean bioquímicos, morfológicos o fisiológicos, que se pueden asociar a la exposición de un tóxico o un estrés ambiental (Fernicola, 1992a).

Estos bioensayos, bioindicadores o biomarcadores se usan generalmente para sustituir la evaluación toxicológica en humanos y en especial, los biomarcadores se utilizan para detectar la presencia de una exposición, determinar las consecuencias biológicas de la exposición, manifestar los estados iniciales e intermedios de un proceso patológico, identificar a los individuos sensibles de una población y fundamentar la decisión de intervenir, tanto a nivel individual como ambiental (Butterworth, 1995). Los organismos que se emplean principalmente, son especies que se cree tienen una respuesta tóxica similar a la de los humanos. Los mamíferos son los organismos utilizados más comúnmente, en especial los roedores, aunque en esta época el uso de otros bioensayos es muy utilizado, ya sean desde los organismos más simples como las bacterias y los virus hasta los más complejos como las plantas, insectos, entre otros (Brusick, 1987).

Los bioindicadores, bioensayos y biomarcadores deben ser económicos, medibles, de fácil interpretación y manipulación, que puedan evaluar mezclas o más de un ambiente (acuático, terrestre y aéreo) (Butterworth, 1995), que den resultados en poco tiempo y se puedan traslapar a otros organismos especialmente al humano y

sobre todo que sea muy eficiente trabajar con él, que tenga sensibilidad y reproducibilidad, entre muchas otras características (de la Lanza, 2003).

Dentro de la evaluación de los agentes tóxicos en los sistemas biológicos, también es importante valorar otros parámetros como la movilidad del mutágeno dentro del organismo (toxicocinética); así como lo que hace, sus mecanismos de acción y sus efectos (toxicodinámica), entre otros (Fernícola, 1992a).

A pesar de existir una gran variedad de bioindicadores, bioensayos y biomarcadores, los que presentan una gran importancia son los biomarcadores genéticos, debido a que se pueden observar mutaciones genéticas o aberraciones cromosómicas, enfermedades hereditarias, en ocasiones la pérdida de la capacidad reproductiva y la inducción de cáncer, es decir, nos indican los cambios o alteraciones que produce un agente químico al DNA (Fernícola, 1992a).

1.6 *Drosophila melanogaster* como bioensayo

Dentro de los organismos antes mencionados, *Drosophila melanogaster* Meigen, 1830, es un buen bioensayo, para los estudios de toxicidad y principalmente los de genotoxicidad, debido a que estos insectos presentan un ciclo de vida corto de 10 a 14 días (Fig. 5), son fáciles de cultivar en el laboratorio, además de presentar sólo cuatro pares de cromosomas perfectamente mapeados. Al mismo tiempo en este organismo se pueden evaluar mutágenos y promutágenos que se pueden identificar en el hombre, debido a que cuenta con una fracción cromosómica similar a la fracción S-9 del hígado de mamíferos, con enzimas que están involucradas en la degradación o activación *in vivo* de sustancias mutagénicas o carcinogénicas, lo que permite evaluar compuestos tanto de acción directa o indirecta (Gaytán, 1993).

Otras ventajas de trabajar con este organismo son: que es económico, versátil y eficiente, ampliamente conocido genéticamente (Gaytán, 1993); con descendencia numerosa, con cromosomas muy grandes, con dimorfismo sexual (Fig. 6); y se pueden realizar estudios en células somáticas y células germinales facilitando los estudios citogenéticos (Muñoz, 1994).

Drosophila melanogaster, es un bioensayo muy versátil que permite detectar la inducción de mutaciones letales recesivas ligadas al sexo, mutaciones letales dominantes y mutación y recombinación somática, así como traslocaciones, deleciones, duplicaciones y no disyunción (Muñoz, 1998), efectos teratogénicos, conductuales y reproductivos.

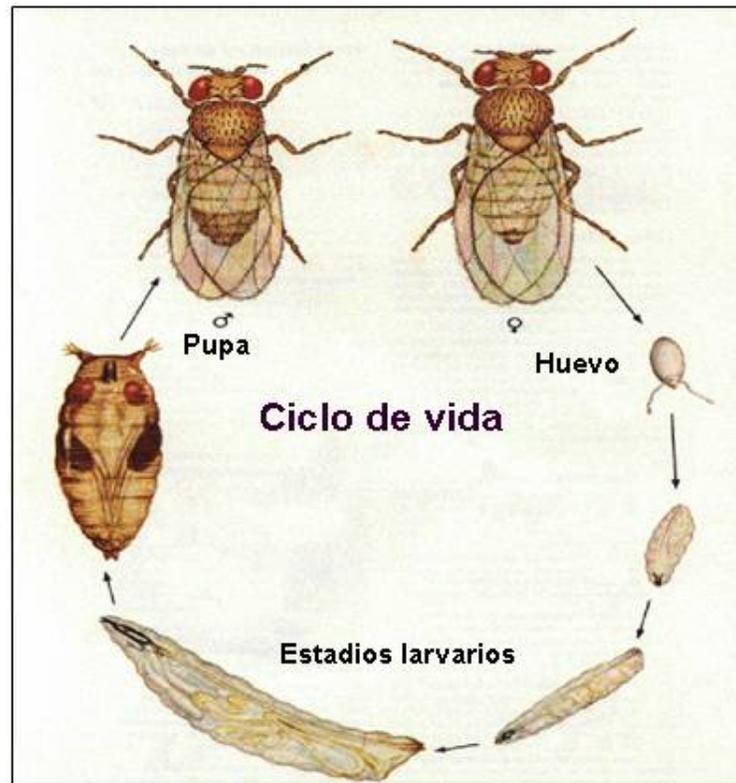
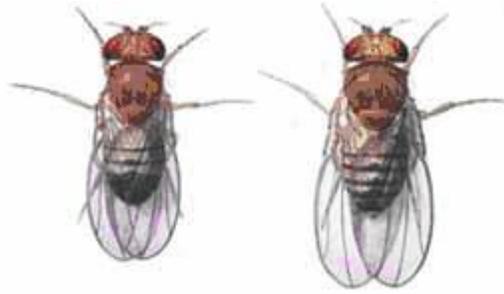


Figura 5. Ciclo de vida de *Drosophila melanogaster* (Modificado de http://biology.kenyon.edu/courses/biol114/Chap12/Chapter_12b2.html)



**Figura 6. Macho y hembra de *Drosophila melanogaster*.
(Ramos *et al.*, 1993)**

1.7 Prueba de Mutación y Recombinación Somática (SMART)

Una de las pruebas más utilizada actualmente con *Drosophila melanogaster* es la “Prueba de Mutación y Recombinación Somática (SMART)”, la cual permite evaluar actividad mutagénica y recombinogénica en células somáticas (Gaytán, 1993).

La prueba de SMART es muy sensible, debido a que detecta compuestos de estructura química muy variada que pueden inducir mutación y recombinación a nivel somático, esta prueba presenta la ventaja de que es económica, rápida y se basa en utilizar células de los discos imagales, que son células indiferenciadas (totipotenciales), las cuales se encuentran determinadas genéticamente y dan lugar a estructuras del adulto como son: ojo, ala, labrum, genitales, etc. (Gaytán, 1993 y Ramos *et al.*, 1993) (Fig. 7).

En la prueba de SMART, los resultados se obtienen en una sola generación de moscas con un genotipo tal que, si en las etapas larvarias, algún agente llega a interactuar con las células de los discos imagales, puede ocurrir una alteración que modifique su información y dará un clon celular que se observa como una mancha

distinguible en el adulto, cuando se utilizan los marcadores apropiados (Muñoz, 1994).

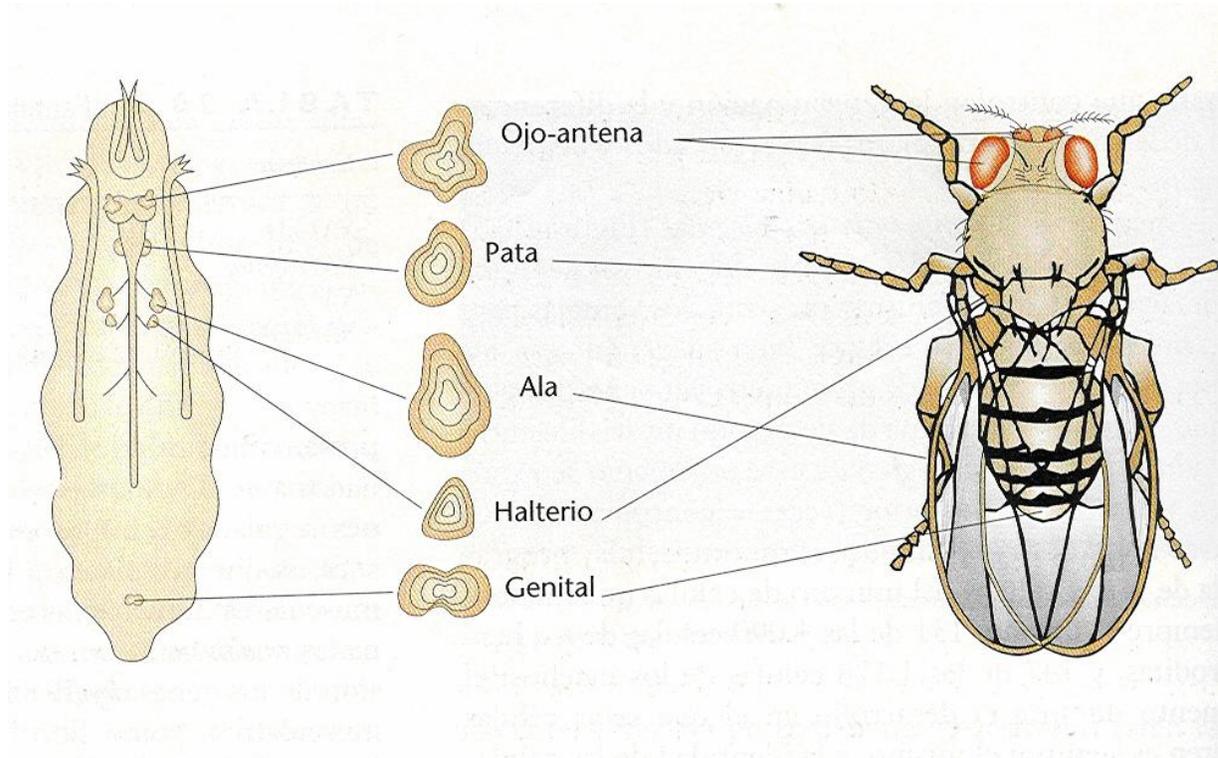


Figura 7. Discos imagales en *Drosophila melanogaster* (Klug y Cummings, 1999).

Existen dos versiones de la prueba SMART, una de ellas utiliza las células de los discos imagales de las alas de la mosca e implica dos marcadores somáticos o fenotípicos: *flr*³ (flare, pelos en forma de flama) con un cromosoma balanceador TM3, Ser (Serrata); y *mwh* (múltiple wing hair), pelos múltiples por célula. Los resultados se observan como manchas gemelas (*flr* y *mwh*), y manchas chicas (*mwh*) o grandes (*flr*), las cuales se les conoce como manchas simples; en las primeras sólo se detecta el evento genético de recombinación mitótica entre un marcador y el centrómero, y en las segundas se reflejan diversas alteraciones genéticas como son:

delección, recombinación entre dos marcadores, mutación puntual, pérdida cromosómica y no disyunción (Graf *et al.*, 1994 y Ordaz, 1998). (Fig. 8).



Figura 8. Manchas en ala (Gaytán, 1993)

En la segunda versión de la prueba de SMART, se utilizan los discos imagales de los ojos a diferencia de la anterior, ésta sólo utiliza un marcador fenotípico ligado al X, en este caso white (w = white), ojos color blanco puro y su forma alternativa de color rojo, que es alguna línea silvestre (w^+ = ojo rojo). Los resultados se observan como manchas chicas y grandes, para así, conocer la frecuencia de inducción de los clones en relación con el número real de células expuestas y el tamaño de las manchas. A diferencia de la anterior, esta versión refleja principalmente recombinación mitótica entre un marcador y el centrómero, y cualquier mutación. Esta versión es menos específica (Vogel, 1985) (Fig. 9).

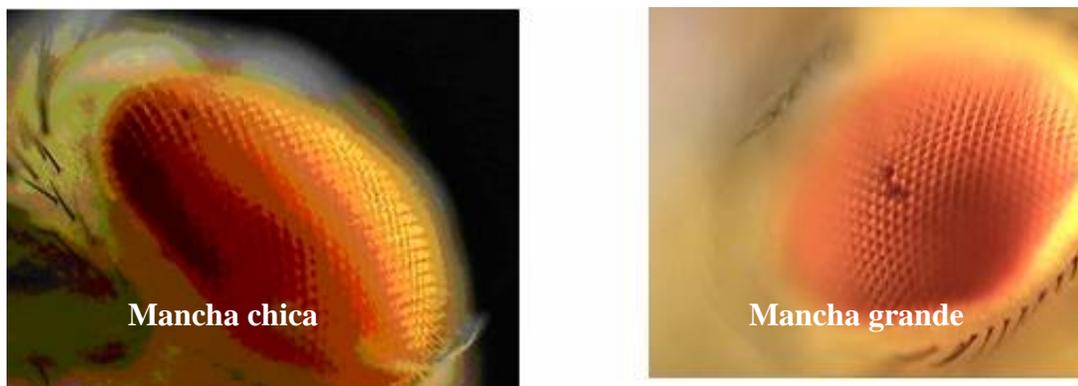


Figura 9. Manchas en ojos

1.8 El ojo de *Drosophila melanogaster*

El ojo compuesto de *Drosophila melanogaster*, es un excelente modelo para el estudio de patrones a pequeña escala. Consta de unidades elementales llamadas omatidias, estas células se dividen continuamente a lo largo de los periodos larvales, en el primer estadio se encuentran cerca de 20 células precursoras de las omatidias, en el segundo periodo larval hay de 100 a 150 células y en el tercer estadio larval se encuentran de 750 a 800 (Hernández, 1993)

Cada omatidia está compuesta por un lente formado por 4 células, que se enfocan en la luz baja del canal y 8 células fotorreceptoras (R1 – R8) arregladas en patrones precisos de los canales. Muchas omatidias se observan alrededor del ecuador del ojo y el arreglo de las células fotorreceptoras en ellas aparece en patrones de puntos. Los fotorreceptores son neuronas sensoriales enlongadas que llevan una cerda mecanosensora o fotosensible en cada omatidia. Cada cerda está compuesta por 4 células. Rodeando los lentes y sobre los receptores se encuentran las células del cono y 2 células pigmentarias primarias, las cuales dan lugar a la cornea. Encerrando y aislando el canal de luz de cada omatidia se encuentran las células pigmentarias secundarias y terciarias. En la base de la retina hay una red de células subretinales pigmentadas (Lawrence, 1992).

Consta también de un rabdómero que se ubica en la parte central de esta estructura y consta de dos tipos de receptores; los receptores externos (R1 – R6) que adquieren un patrón asimétrico trapezoidal y los receptores internos (R7 y R8), que se encuentran a lo largo del eje central (Hernández, 1993) (Fig. 10).

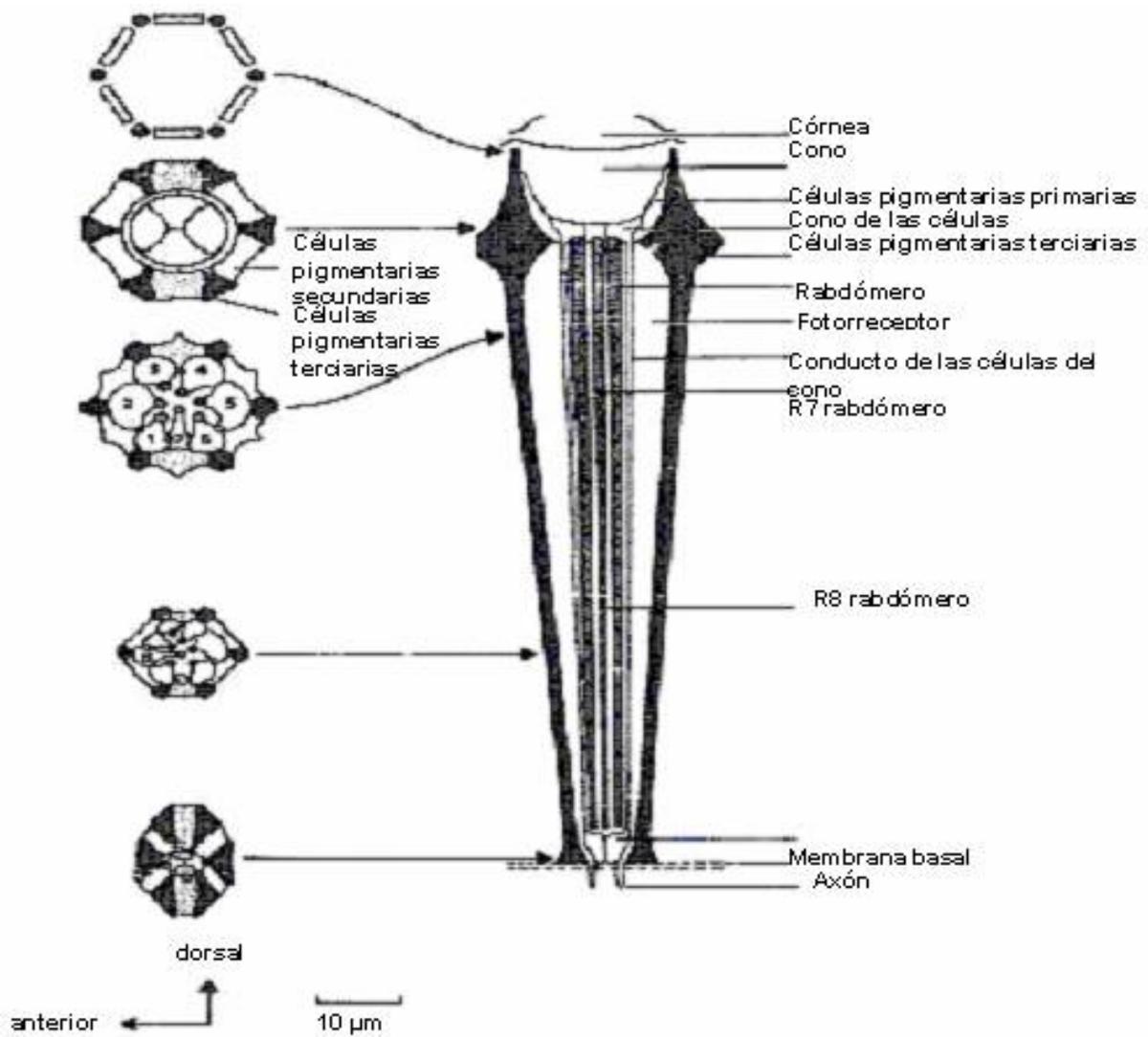


Figura 10. Estructura de una ommatidia. Sección longitudinal y cinco cortes de las secciones (Modificado de Lawrence, 1992).

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar con base en estudios etnomicológicos, los efectos tóxicos y genotóxicos de extractos metanólicos de hongos macromycetes, colectados en el estado de Hidalgo, México.

2.2 OBJETIVOS PARTICULARES

1. Determinar el efecto tóxico en mamíferos (*Rattus norvergicus*) e insectos (*Drosophila melanogaster*) de los extractos metanólicos obtenidos.
2. Determinar el potencial genotóxico por medio de la Prueba de Mutación y Recombinación Somática (SMART), en células somáticas del ojo de *Drosophila melanogaster*, de los extractos metanólicos obtenidos.
3. Analizar la posible relación de la toxicidad y la genotoxicidad de los extractos metanólicos con los datos etnomicológicos reportados.

3. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

3.1. TRABAJO DE CAMPO, COLECTA Y ALMACENAMIENTO

3.1.1 Elección del área de estudio y selección de macromycetes

Gracias a reportes bibliográficos, así como a estudios etnomicológicos, realizados por el Laboratorio de micología, del Centro de Investigaciones Biológicas (CIB) de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo (UAEH); relacionados con el uso y explotación de los hongos de manera tradicional, se eligieron entre las diferentes regiones del estado de Hidalgo, aquellas que contaron con reportes de consumo humano de hongos macromycetes. A partir de estos estudios se seleccionaron las especies relacionadas con posibles efectos tóxicos registrándose las comunidades en que se presentan (Romero, 2002, Hernández, 2007 y Rodríguez, 2007).

3.1.2 Recolección de muestras

Una vez seleccionado el género y su área de distribución, se realizaron colectas en el periodo de lluvias (mayo a agosto), para su posterior identificación taxonómica en el laboratorio de micología (Fig. 14).

Las colectas se realizaron de manera convencional o estándar, se sacó del sustrato el hongo completo y se colocó preferentemente en hojas de papel cera, para transportarlo en canastas hasta el laboratorio; esto con el propósito de que se conserve completo y fresco para el análisis de sus características macroscópicas y microscópicas (Largent *et al.*, 1973 y Cifuentes *et al.*, 1986).

Después de la colecta, se registró la cantidad de cada una de las muestras, hasta obtener de manera homogénea un kilo de peso fresco de cada una de las especies a estudiar antes de ser deshidratadas (Romero, 2002).

Para su deshidratación (Fig. 14), se colocaron las muestras en una secadora o deshidratadora durante 24 horas; con una temperatura de más de 35°C y no más de 60°C, pudiendo variar el tiempo que se requiera para deshidratar totalmente la muestra, dependiendo del género o el tipo de hongo con que se esté trabajando (Montoya, 1997).

3.2. TRABAJO DE LABORATORIO

Una vez que se recolectaron, almacenaron y se deshidrataron los hongos se procedió al trabajo de laboratorio el cual consistió en los siguientes pasos:

3.2.1 Obtención de extractos

La obtención de extractos (Fig. 14), se realizó a través de una destilación por reflujo, sustentado en que esta técnica es la más recomendada para obtener extractos más concentrados y menos alterados (Domínguez, 1973; Valencia, 1995 y Brown *et al.*, 1998).

Para ello, se requirió realizar los siguientes pasos:

Se fragmentaron los hongos secos en trozos pequeños de menos de 1 cm de diámetro para que pueda haber una mejor penetración del diluyente (metanol) en éstos, una vez cortados se colocaron en un matraz de bola con suficiente metanol absoluto para cubrirlos, posteriormente se pusieron a destilar por reflujo en una

canastilla de calentamiento durante 4 a 6 horas a una temperatura aproximada de 30 a 40°C (Fig. 11).



Figura 11. Destilación por reflujo

Posteriormente se colocó el extracto en un embudo de separación, se filtró a la salida con algodón y se colocó en otro matraz de bola limpio para eliminar el diluyente (metanol) y obtener el extracto sin disolvente (Fig. 10). Para ello se colocó el destilado ya filtrado en un rotavapor (Büchi Watherbath, mod. B- 480) a una temperatura aproximada entre 40 a 45°, con movimientos rotatorios lentos, a una presión aproximada de 170 MB y con un vacío moderado; hasta que se obtuvo en el extracto una consistencia pastosa, lo cual indica que se ha obtenido un grado de pureza y se ha eliminado por completo el diluyente (Fig. 12); posteriormente los extractos se restituyeron con metanol hasta obtener una dilución homogénea en ambos hongos, en el caso de *B. satanoides* se restituyo hasta obtener 10 ml de extracto y para *T. felleus* se obtuvo 7 ml de extracto, esto para su mejor manejo.



Figura 12. Obtención de extractos puros

Finalmente los extractos obtenidos de cada uno de los hongos se dividieron en tres partes iguales; la primera parte para la evaluación de toxicidad vía oral en mamíferos (*Rattus norvegicus*, cepa Winstar), la segunda parte para evaluar la toxicidad vía oral insectos (*Drosophila melanogaster*) así como su evaluación genotóxica por medio de la técnica de SMART en ojos, y la tercera parte del extracto se utilizará para la identificación de compuestos por medio de la técnica de cromatografía de gases (este ultimo se realizara de manera independiente para otras investigaciones).

3.3. Evaluación de toxicidad

Una de las primeras pruebas en cualquier evaluación biológica de un agente químico es la de la toxicidad, la cual se refleja por un índice de mortandad posterior a una exposición, y se requiere realizar en al menos dos bioensayos para descartar falsos positivos y falsos negativos; para ello en el presente trabajo se evaluó la

toxicidad de los extractos metanólicos de dos hongos macromycetes, por vía oral en mamíferos, en este caso ratas (*Rattus norvegicus Berkenhout, 1769*, cepa Winstar) y posteriormente en insectos, en la mosca de la fruta (*Drosophila melanogaster*) (Hernández, 1993).

Para ello se realizaron tratamientos de manera independiente en ratas y moscas (Fig. 14):

3.3.1 Mamíferos: Para esta evaluación se utilizaron ratas (*Rattus norvegicus*) de la cepa Winstar, utilizando el extracto de cada hongo restituido con metanol para su mejor manejo, con una dilución en agua en una proporción 1:1 que se administró durante 24 horas de manera oral a 4 ratas hembras adultas, evaluándose finalmente el índice de mortalidad; simultáneamente se requiere correr un control negativo (agua) como índice de comparación.

3.3.2 Insectos: Para esta evaluación se utilizaron larvas de moscas de la fruta (*Drosophila melanogaster*) de la cepa white (w/w) de 72 horas de edad, colocando 10 larvas en un vial con sacarosa con 2 ml de cada extracto de manera independiente a una dilución 1:1 en agua durante 24 hrs con una repetición, evaluándose al término de éste, el índice de mortalidad, de igual forma, se corrió paralelamente un control negativo (Sacarosa al 5%) como índice de comparación (Vogel, 1987).

3.4. Evaluación de genotoxicidad

Las pruebas de genotoxicidad, son un segundo tipo de pruebas que permiten evaluar daños colaterales, pero que dependen de utilizar exclusivamente dosis

subtóxicas, sustentado en que la toxicidad no encubra dichos efectos secundarios, estos resultados complementan los datos obtenidos en las pruebas de toxicidad (Fig. 14).

Para la identificación de las dosis subtóxicas se requirieron hacer curvas de toxicidad a diferentes concentraciones para encontrar la “Concentración Letal 50” (CL₅₀), la cual se considera como la concentración máxima para evaluar los efectos secundarios (Gottschalk, 1984).

3.4.1 Curvas de toxicidad.

De manera inicial se requirió determinar las dosis experimentales en *Drosophila melanogaster* de los extractos a evaluar, las cuales se necesitan de manera preliminar para realizar la prueba de SMART; para ello se utilizaron larvas de 72 horas de la línea white (w/w) al igual que en las pruebas de toxicidad, éstas se colocaron en al menos 3 concentraciones diferentes de cada extracto, con el objetivo de encontrar las concentraciones subtóxicas a través de establecer la concentración letal 50 (CL₅₀), la cual se conoce como la cantidad de sustancia que conduce a la pérdida del 50% de los organismos tratados, a fin de garantizar un número suficiente de mutantes (Gottschalk, 1984).

Las diluciones utilizadas en este tratamiento fueron las siguientes:

Tabla I. Diluciones utilizadas para obtener la CL₅₀.

Diluciones	2:1	5:1	11:1
Agua	2 ml	2.5 ml	2.75 ml
Extracto	1.0 ml	0.5 ml	0.25 ml

En dichas curvas de toxicidad, se utilizaron 2 tubos por cada tratamiento (2 replicas), cada uno de estos, contiene sacarosa suficiente para cubrir el fondo del tubo, con 1.5 ml. de cada proporción, a la cual se le agregaron 10 larvas de 72 horas de edad, las cuales se mantuvieron en los tubos durante 24 horas, con el objetivo de observar efectos tóxicos y establecer las concentraciones subtóxicas.

3.4.2 Prueba de Mutación y Recombinación Somática (SMART) en ojos de *Drosophila melanogaster*.

En esta prueba, se utilizaron organismos heterocigos para el marcador de ojo white (w/w^+), el cual es un marcador genético fácilmente detectable (Hernández, 1993), el marcador white ($w = \text{white}$), presenta ojos color blanco puro, y es el primer mutante encontrado en *Drosophila* (Ramos *et al.*, 1993); y el marcador silvestre se expresa como ojos de color rojo (w^+), utilizándose la cepa silvestre Cantón-S (Lindsley y Zimm, 1992 y Gaytán, 1993) (Fig. 13).



Figura 13. Línea White (w) y Cantón- S (w+).

Modificado de www.healthynebraska.com/fruitfly.gif

Una parte importante en los estudios de genotoxicidad es la duración del tratamiento, muchos de éstos se clasifican en tres categorías: agudo, subcrónico y crónico. La duración de cada tipo de estudio depende del organismo (Brusick, 1987).

Los dos tipos básicos de exposiciones o tratamientos para compuestos tóxicos son: la exposición aguda y crónica. La primera se aplica para eventos simples con una cantidad particular de la sustancia, la cual entra al organismo como una sobredosis del compuesto. Mientras que el tratamiento crónico es para exposiciones repetidas de las sustancias, las cuales pueden acumularse o causar un efecto tóxico acumulable (Timbrell, 1989).

La toxicidad aguda usualmente se emplea para evaluar efectos tóxicos que ocurren poco después de la exposición o en el límite de ésta. La toxicidad crónica puede aplicarse a los eventos los cuales ocurren algunas semanas, meses o años después de la exposición para una o más dosis repetitivas o posiblemente después de una exposición aguda para una sustancia toxica particular (Timbrell, 1989).

En la mayoría de los casos van relacionados el tipo de tratamiento y la forma de exposición o administración, el cual es determinado por sus propiedades físicas y químicas de la sustancia tóxica. Por ejemplo, gases y vapores están relacionados a la exposición por inhalación, mientras que los líquidos ocasionan problemas relacionados al contacto con la piel. Muchas industrias químicas son frecuentemente relacionadas con efectos crónicos debido a la exposición a largo plazo. Mientras que las sustancias caseras o naturales son usualmente involucradas a envenenamiento agudo posterior a una exposición accidental (Timbrell, 1989).

En los individuos expuestos accidentalmente o no, los agentes tóxicos pueden ingresar por diversas vías, ya sea por vía respiratoria, digestiva o dérmica.

De manera particular, la vía de exposición gastrointestinal o vía de administración oral es una de las rutas más importantes para muchas drogas, contaminantes, aditivos de comida, productos naturales y otras sustancias potencialmente tóxicas (Timbrell, 1989).

3.4.3 Tratamiento agudo

Para este estudio, se realizaron tratamientos agudos con cada uno de los extractos mediante administración oral, con el objetivo de que la forma de

administración y exposición fuera lo más parecida a la forma de consumo en los humanos (Fig. 14).

Para estos tratamientos, primero se realizó la cruce progenitora entre hembras vírgenes de ojos blancos (w / w) y machos de ojos rojos (w^+ / Y) de su respectiva línea (Tabla II, Fig. 14).

Tabla II. Cruza progenitora en *Drosophila melanogaster* para la prueba de SMART en ojos

♀ w / w x ♂ w^+ / Y

♀ \ ♂	w^+	Y
W	w / w^+	w / Y
W	w / w^+	w / Y

A las 72 horas después de la cruce progenitora se obtuvieron las larvas para los tratamientos, dividiéndose las larvas colectadas en el número de lotes experimentales que se tengan, repitiendo el proceso hasta obtener al menos 300 moscas adultas heterocigas (w / w^+) (hembras de ojos rojos), por cada tratamiento; estas moscas se obtuvieron separando hembras y machos en etapa adulta.

Para este experimento se usaron 6 viales por proporción, al igual que para el control negativo (sacarosa al 5%) y como control positivo el metil metano sulfonato (MMS) a una concentración de 0.1 mM (Delgado, 1990).

Por cada tratamiento en cada vial se colocó sacarosa con 1.5 ml de la proporción 5:1 durante 6 horas (tratamiento agudo), se colocaron aproximadamente 100 larvas en cada vial, esto para obtener una buena cantidad de individuos adultos. Después de las 6 horas se sacaron las larvas de los viales y se colocaron en frascos con medio de cultivo nuevo con la finalidad de que terminaran su ciclo de vida y obtener las moscas adultas para el análisis microscópico de los ojos.

3.4.4 Análisis microscópico de ojos

Posterior a la eclosión, se obtuvieron los adultos para realizar la observación de clones celulares (manchas) en los ojos con fenotipo white sobre contexto silvestre, registrándose el tamaño y frecuencia de éstos. Para ello, los adultos se sacrificaron con éter, se separan machos y hembras, las últimas heterocigas (w/w) (hembras de ojos rojos); éstas se colocaron en una solución consistente de 90 partes de etanol, 1 parte de Tween 80 y 9 partes de agua, con la finalidad de conservar por más tiempo hidratando el ojo y poder observarlos mejor debido a que se mantienen mejor sus características físicas, además de que al sumergirlas en dicha solución se disminuye la difracción de la luz (Fig. 14).

Se observaron los ojos al microscopio estereoscópico con un lente adicional de 4X ayudado con lámparas externas para mejor iluminación. Se observaron y contaron los clones celulares, así como el número de omatidias afectadas por clon, para posteriormente realizar las pruebas estadísticas (Vogel, 1987).

3.4.5 Pruebas estadísticas

Para este análisis, de manera inicial, se realizó una separación entre manchas chicas y manchas grandes, las primeras son las que tienen dañadas de 1 a 4 omatidias y las segundas más de 4, y después se determinó el índice de manchas por tratamiento para manchas chicas, grandes y totales (Hernández, 1993).

Para calcular la mutagénicidad efectiva en las células de los discos de los ojos por tratamiento, se sugiere según la bibliografía el uso de la siguiente relación (Vogel, 1987):

$$f = n \cdot m / N \cdot c$$

Donde **f** es la frecuencia de manchas, **m** es el tamaño promedio del clon, **n** es el número de manchas, **C** es el número de omatidias por ojo (800), y **N** es el número de ojos analizados. Esta ecuación provee una buena estimación de los clones por 10^4 , y esto permite determinar la frecuencia exacta de inducción de clones en relación con el número real de células expuestas. Sin embargo la literatura sugiere también el cálculo de la frecuencia de clones $\times 10^4$ para correlacionar y determinar mejor la eficacia mutagénica, que justamente se calcula de la frecuencia de las manchas por ojo, tomando como criterio que en el caso de que no haya consistencia en ambos cálculos se requiere repetir el experimento aumentando el tamaño de muestra (Vogel, 1987).

Para evaluar el efecto genotóxico de los compuestos utilizados se realizó una prueba de X^2 (Chi cuadrada) de proporciones, que nos reveló resultados positivos, negativos, débil positivo e inconclusos como lo sugiere la bibliografía (Frei y Würigler,

1988). Esta prueba se basa en comparar la serie de los tratamientos contra el control, y decidir si el compuesto es mutagénico o no, por lo que se requiere contar con una hipótesis nula (H_0) y una hipótesis alterna (H_A); las cuales son excluyentes una de la otra; y que permiten determinar el daño genotóxico inducido por el extracto evaluado (Frei y Würigler, 1988).

En la Hipótesis nula (H_0), se asume que no hay diferencia entre la frecuencia de mutación entre el control y el tratamiento, y ésta se acepta estadísticamente, cuando no hay un incremento de “m” veces mas alta la frecuencia de mutaciones con respecto al control.

La Hipótesis alterna (H_A), se acepta si hay diferencia entre los resultados obtenidos del tratamiento con el control, esto se presenta cuando los resultados obtenidos del tratamiento tienen un incremento significativo, es decir, la frecuencia de mutación es “m” veces más alta en el tratamiento comparada con la frecuencia de mutación espontánea (control). Si se rechaza indica que el tratamiento no produce un incremento requerido para considerar que el compuesto es mutagénico, mientras que si se acepta es todo lo contrario, significa que el compuesto a evaluar es capaz de inducir un daño genotóxico a las concentraciones y condiciones evaluadas (Frei y Würigler, 1988).

El valor “m” es el número de veces que debe aumentar la frecuencia de mutación de la serie testigo y ha sido determinado estadísticamente, “m” es igual a dos para las manchas chicas y totales ya que su frecuencia de aparición es alta, y “m” es igual a cinco para manchas grandes debido a que su frecuencia es relativamente baja (Hernández, 1993).

La interpretación de los datos estadísticos se hace bajo la siguiente premisa; si se acepta la (H_0) y se rechaza la (H_A), el resultado indica que el compuesto es negativo (-), pero si se acepta la (H_A) y se rechaza la (H_0), el compuesto es positivo (+) y será por lo tanto genotóxico; pero en cambio si se rechazan las dos hipótesis se dice que el resultado del tratamiento es débil positivo o débilmente mutagénico (**d**); por otro lado si se aceptan las dos hipótesis el resultado es considerado indeterminado o inconcluyente (**i**) (Frei y Würigler, 1988) (Fig. 14).

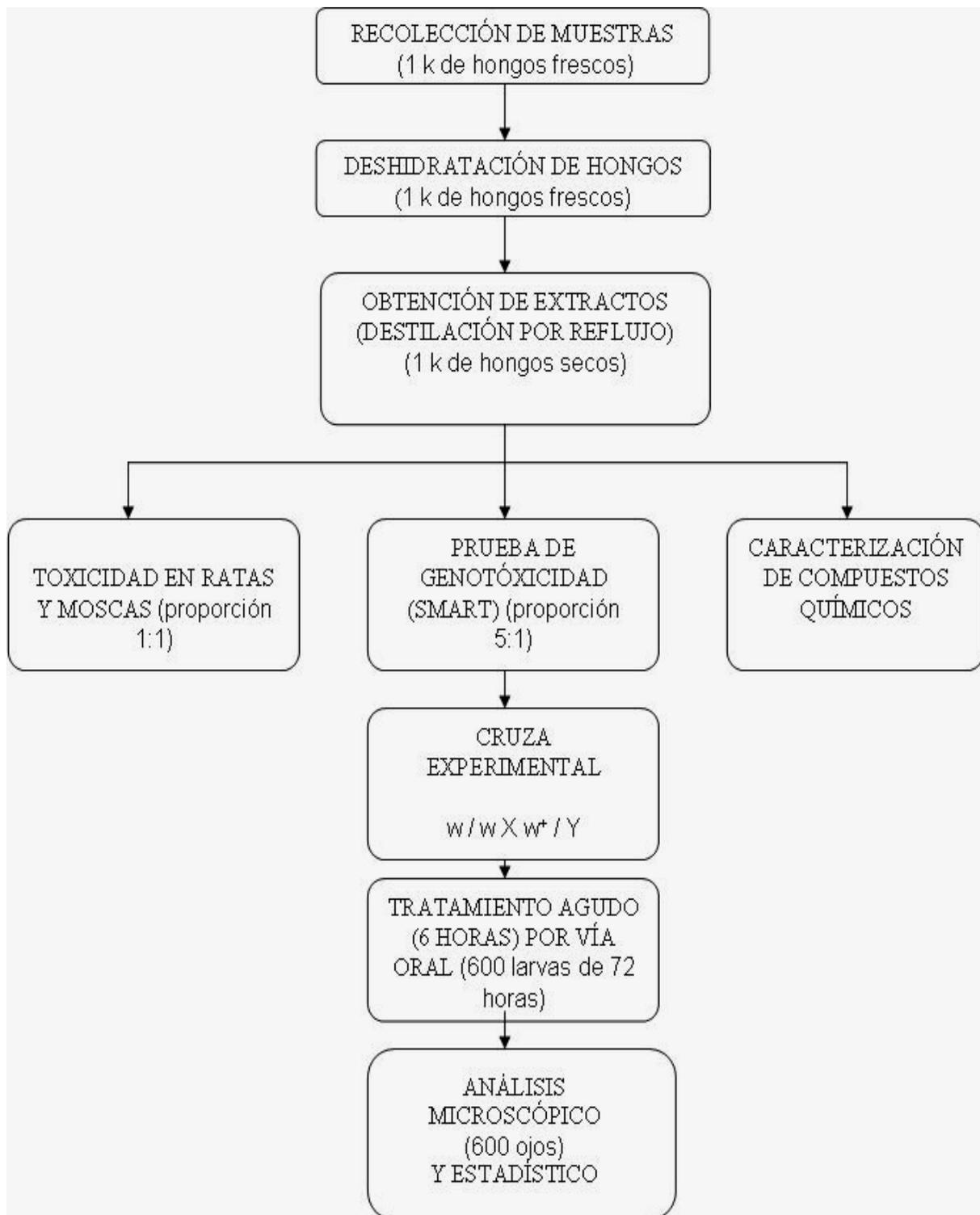


Figura 14. Cronograma del procedimiento experimental

4. RESULTADOS

4.1. Estudios etnomicológicos

De acuerdo con los objetivos del presente trabajo, la revisión bibliográfica, los estudios etnomicológicos y a las encuestas realizadas de manera escrita en el “Parque Nacional el Chico” (Anexo 1) y de manera verbal en Zacualtipán, inicialmente se eligieron estas dos regiones dentro del estado de Hidalgo, en donde se colectaron los hongos estudiados con base en su presencia en las zonas de estudio y a su toxicidad reportada, en éstas dos regiones se cuenta con reportes de efectos tóxicos de la familia Boletaceae, de la cual se decidió estudiar al menos dos especies, *Boletus satanoides* y *Tylopilus felleus*, de las que se obtuvieron los extractos y se realizaron las pruebas de toxicidad y de genotóxicidad (Fig. 3).

4.2. Obtención de extractos

Con relación a la obtención de los extractos metanólicos de los hongos seleccionados, para su posterior análisis químico y biológico, es importante mencionar que en cuanto a la identificación de los diferentes elementos que lo componen, no forman parte del presente trabajo, pero se conservaron muestras para su posterior análisis químico, que se correlacionaran en el futuro con los efectos biológicos que se reportan más adelante en el presente trabajo.

Buscando optimizar la extracción de los diferentes componentes de las muestras se modificó la técnica de la siguiente manera basándose en pruebas preliminares: inicialmente se dejaron los hongos durante ocho días en metanol previos a la destilación, pese a que la técnica original no lo requiere, como se puede

observar en la tabla III, la extracción con o sin interacción del hongo con el metanol fue diferente como para no considerar dicha modificación en la técnica.

Tabla III. Tabla de rendimiento para la obtención de extractos metanólicos.

Tiempo de interacción Hongo/metanol antes de la destilación	Especie evaluada	Peso fresco del hongo	Volumen de extracto obtenido
8 días	<i>Boletus satanoides</i>	1 Kg	1.5 ml/ kg
	<i>Tylopilus felleus</i>	1 Kg	0.90 ml/ Kg
10 minutos	<i>Boletus satanoides</i>	1 Kg	10 ml/ kg
	<i>Tylopilus felleus</i>	1 Kg	7 ml/ kg

4.3. Pruebas de toxicidad

Las pruebas de toxicidad son estudios de corta duración que permiten establecer la relación entre la concentración, el tiempo de exposición, la toxicidad propia del compuesto a evaluar y la susceptibilidad del bioensayo a utilizar (Reyes y Almeida, 1992), para ello en el presente trabajo se realizaron dos pruebas con diferente ensayos: en ratas (*Rattus norvegicus*, cepa Winstar) y en moscas (*Drosophila melanogaster*).

4.3.1 En cuanto a la toxicidad en ratas (*Rattus norvegicus*, cepa Winstar) no se observó toxicidad con ninguno de los dos extractos en la dilución probada; la cual consistió en diluir 1 ml que se disponía en un volumen suficiente de agua para que fueran ingeridos en su totalidad en un periodo de 24 horas a los organismos expuestos, quedando una dilución 1:1, registrándose 0 % de mortalidad para ambos extractos.

4.3.2 Para evaluar la toxicidad en moscas (*Drosophila melanogaster*), se probó la misma concentración como índice de comparación, observándose toxicidad en ambos extractos con 95 % de mortalidad para *Boletus satanoides* y 60 % para *Tylopilus felleus*; partiendo de estos resultados se probaron a concentraciones menores arbitrarias cada uno (curvas de toxicidad), con el objetivo de identificar la CL₅₀, y a partir de ésta establecer una dosis subtóxica para realizar el ensayo de genotoxicidad, a través de la Prueba de Mutación y Recombinación Somática (SMART) en células del ojo (Tabla IV).

Como se puede observar en la tabla IV, en los resultados de toxicidad en *Drosophila*, se determinó sólo el índice de mortalidad y no se pudo establecer la CL₅₀, debido a la cantidad limitada de extracto, por lo que se decidió para la genotoxicidad de los dos compuestos evaluar la dilución 5:1, que permite valorar los efectos a nivel del DNA sin que la toxicidad los encubra.

Tabla IV. Valores promedio \pm desviación estándar y porcentaje de mortalidad de *Drosophila melanogaster* con dos extractos de hongos, de dos replicas.

Diluciones	n	Mortalidad \bar{X}	Mortalidad %
2:1	20	19 \pm 0.5	95
5:1	20	8 \pm 1.7	40
11:1	20	7 \pm 1.2	35
Diluciones	n	Mortalidad \bar{X}	Mortalidad %
2:1	20	12 \pm 2.8	60
5:1	20	10 \pm 0.1	50
11:1	20	9 \pm 0.7	45

4.4. Genotóxicidad

Como ya se mencionó anteriormente la genotóxicidad es el efecto ejercido por algún agente exógeno sobre el material genético, para su evaluación se requiere comparar al compuesto en cuestión, con un control negativo, el cual tiene un efecto inocuo para la toxicidad; así como también un control positivo, de igual forma que el anterior se refiere a un agente químico que por reportes científicos anteriores, se conoce que tiene un efecto genotóxico; ambos casos sirven como parámetros de comparación.

Ésta se evaluó en *Drosophila melanogaster* a través de la prueba SMART debido a las múltiples ventajas como bioensayo y a la alta especificidad y sensibilidad que presenta dicha prueba. En ambos experimentos para el control positivo, se partió de la concentración 0.1 mM, de MMS la cual según reportes bibliográficos es positiva para la inducción de manchas en ala, y al no haber referencia para la prueba en ojo, que se utilizó en el presente trabajo, se procedió a hacer una curva de toxicidad con las siguientes concentraciones: 0.1, 0.05, 0.025 y 0.0125 mM, con el objetivo de conocer la concentración más alta que permita evaluar el efecto genotóxico sin que la toxicidad lo encubra (Delgado, 1990), encontrándose que la concentración de 0.1 mM correspondía a la CL_{55} (Tabla V).

Tabla V. Valores promedio \pm desviación estándar y porcentaje de mortalidad de *Drosophila melanogaster* con MMS, de dos replicas.

METIL METANO SULFONATO				
Concentración	n	Mortalidad	Mortalidad	Concentración letal
		\bar{X}	%	
0.10 mM	20	11 \pm 0.82	55	CL₅₅
0.05 mM	20	5 \pm 3.37	25	CL₂₅
0.025 mM	20	3 \pm 4.08	15	CL₁₅
0.01 mM	20	2 \pm 4.62	10	CL₁₀

Para el control negativo en ambos casos se utilizó sacarosa al 5%, este dato fue obtenido de la literatura, de investigaciones realizadas anteriormente (Delgado, 1990 y Gaytán, 1993).

Como se puede observar en la tabla VI en cuanto a los efectos genotóxicos del extracto metanólico de *Boletus satanoides*, en 600 ojos analizados se indujo un total de 120 manchas, que al compararlas con el control negativo y positivo se mostró un efecto positivo en cuanto a manchas chicas, grandes y totales (Fig. 15).

En cuanto a los resultados obtenidos con la prueba estadística X^2 de proporciones se rechazó la H_0 y se aceptó la H_A , para las manchas chicas, grandes y totales. Por lo que se observó un efecto positivo, en cuanto a los tres tipos de manchas, como se puede observar en la tabla VII.

Los resultados anteriores nos indican que este extracto presenta tanto actividad directa como indirecta, es decir que puede causar daño tanto en las primeras divisiones celulares como en las últimas, en las primeras el compuesto químico como tal y en la última a través de sus metabolitos.

Tabla VI. Número y frecuencia de manchas/ojo obtenidas en cada tratamiento

ANÁLISIS DE CLONES EN OJOS DE <i>Drosophila melanogaster</i> DE TRATAMIENTO AGUDO.														
COMPUESTO	No. OJOS REVISADOS	NÚMERO DE MANCHAS					TOTAL DE MANCHAS	% DEMANCHAS			TAMAÑO X DEL CLON	CLONES X 10 ⁴ CÉLULAS	FRECUENCIA	ACTIVIDAD
		1-2	3-4	5-8	9-64	>64		CHICA (1-4)	GRANDE (>4)	TOTAL				
Sacarosa 5%	600	44	9	4	5	0	62	8.833	1.5	10.33	17.75	45.8	0.00458	-
MMS 0.1Mm	600	151	34	10	10	0	205	30.833	3.333	34.166	40.133	342	0.0342	+
DIAGNÓSTICO								d	+	+				
<i>B. Satanooides</i> 0.5ml	600	87	13	9	11	0	120	16.666	3.333	20	25.352	126.7	0.01267	+
DIAGNÓSTICO								+	+	+				
<i>T. Felleus</i> 0.5ml	600	63	23	11	6	0	103	14.833	2.833	17.166	27.142	116.4	0.01164	+
DIAGNÓSTICO								+	-	+				

Tabla VII. Resultados y diagnóstico de la prueba de X^2 con *Boletus satanoides* comparados con Sacarosa

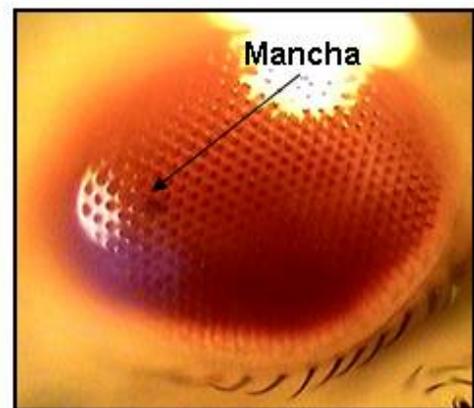
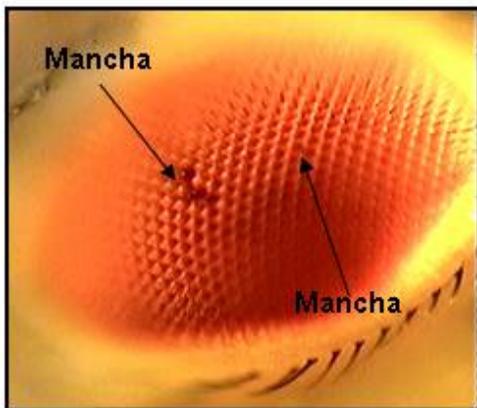
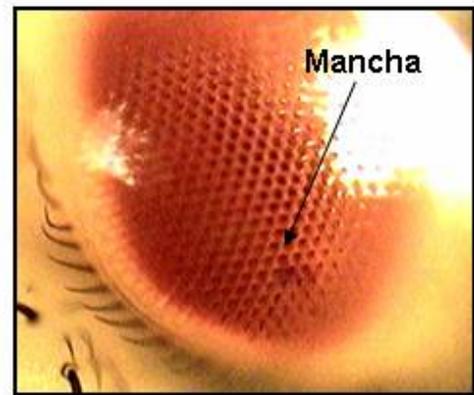
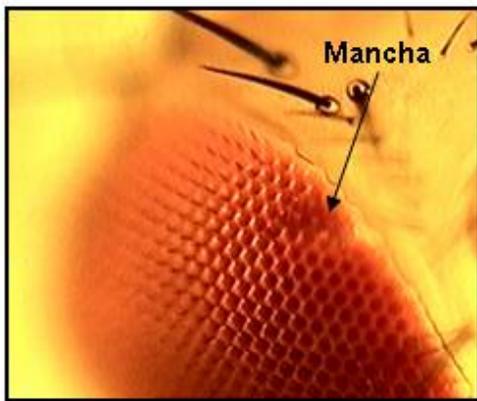
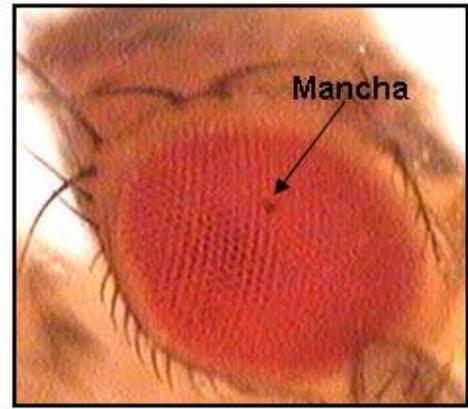
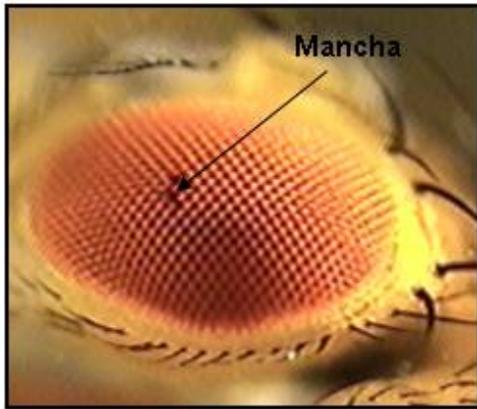
RESULTADOS DE LOS DATOS DE MANCHAS EN OJOS DE <i>Drosophila melanogaster</i> CON <i>Boletus satanoides</i>			
MANCHAS	MANCHAS TOTALES	MANCHAS CHICAS	MANCHAS GRANDES
nc: manchas observadas en el control	62	53	9
nt: manchas observadas en el tratamiento	120	100	20
n= nc + nt	182	153	29
HIPÓTESIS NULA H_0			
p_0: frecuencia de manchas esperadas en el control	0.5	0.5	0.5
q_0: frecuencia de manchas esperadas en el tratamiento	0.5	0.5	0.5
p_0n: manchas esperadas en el control	91	76.5	14.5
q_0n: manchas esperadas en el tratamiento	91	76.5	14.5
PRUEBA DE CHI CUADRADA	18.49	14.44	762.83
CONCLUSIÓN H_0 ($\alpha= 0,05$)	RECHAZADA	RECHAZADA	RECHAZADA
HIPÓTESIS ALTERNIA H_A			
m: factor de multiplicación	2	2	5
p_A: frecuencia de manchas esperadas en el control	0.333	0.333	0.166
q_A: frecuencia de manchas esperadas en el tratamiento	0.666	0.666	0.833
p_An: manchas esperadas en el control	60.60	50.95	4.81
q_An: manchas esperadas en el tratamiento	121.21	101.90	24.16
PRUEBA DE CHI CUADRADA	0.037	0.103	3.73
CONCLUSIÓN H_0 ($\beta= 0,05$)	ACEPTADA	ACEPTADA	ACEPTADA
DIAGNOSTICO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO

Para el extracto del hongo *Tylophilus felleus* los resultados obtenidos se observan en la tabla VI y VIII; en la primer tabla, en cuanto al número de manchas, se observa que se indujo mayor cantidad de manchas chicas y totales, y una menor cantidad de manchas grandes, por lo que se presenta un efecto positivo en manchas chicas y totales así como un efecto negativo en manchas grandes, esto nos da la pauta de que el extracto es un mutágeno de acción indirecta y que actúa en las ultimas etapas de la división celular (Fig. 15).

Los resultados que se observan en la tabla VIII nos llevan a rechazar la H_0 y a aceptar la H_A , para manchas chicas y totales, por lo que se presenta un efecto positivo, sin embargo; para las manchas grandes se aceptó la H_0 y se rechazó la H_A , lo que indica que tiene un efecto negativo en manchas grandes, se puede decir que el efecto de los extracto es de acción indirecta, es decir; que actúa en las últimas etapas de la división celular.

Tabla VIII. Resultados y diagnóstico de la prueba de X^2 con *Tylophilus felleus* comparados con Sacarosa

RESULTADOS DE LOS DATOS DE MANCHAS EN OJOS DE <i>Drosophila melanogaster</i> CON <i>Tylophilus felleus</i>			
MANCHAS	MANCHAS TOTALES	MANCHAS CHICAS	MANCHAS GRANDES
n_0 : manchas observadas en el control	62	53	9
n_1 : manchas observadas en el tratamiento	103	86	17
n : $n_0 + n_1$	165	139	26
HIPÓTESIS NULA H_0			
p_0 : frecuencia de manchas esperadas en el control	0.5	0.5	0.5
q_0 : frecuencia de manchas esperadas en el tratamiento	0.5	0.5	0.5
$p_0 n$: manchas esperadas en el control	82.5	69.5	13
$q_0 n$: manchas esperadas en el tratamiento	82.5	69.5	13
PRUEBA DE CHI CUADRADA	10.19	7.84	2.50
CONCLUSIÓN H_0 ($\alpha = 0,05$)	RECHAZADA	RECHAZADA	ACEPTADA
HIPÓTESIS ALTERNIA H_A			
m : factor de multiplicación	2	2	5
p_A : frecuencia de manchas esperadas en el control	0.333	0.333	0.166
q_A : frecuencia de manchas esperadas en el tratamiento	0.666	0.666	0.833
$p_A n$: manchas esperadas en el control	54.95	46.29	3
$q_A n$: manchas esperadas en el tratamiento	109.89	92.57	22
PRUEBA DE CHI CUADRADA	1.28	1.37	11.46
CONCLUSIÓN H_A ($\beta = 0,05$)	ACEPTADA	ACEPTADA	RECHAZADA
DIAGNÓSTICO	POSITIVO (+)	POSITIVO (+)	NEGATIVO (-)



(a)

(b)

Figura 15. Manchas en ojos de *Drosophila melanogaster* inducidas con *Boletus satanoides* (a) y *Tylopilus felleus* (b).

El metil metano sulfonato es un compuesto reportado en la literatura como un mutágeno de acción directa; por este motivo se observó un número mayor de manchas grandes y un número menor de manchas chicas y totales; por lo que se presentó una respuesta positiva para manchas grandes y una respuesta débil positiva para manchas chicas y totales (Tabla VI) (Fig. 16); en relación a la frecuencia de clones y a los clones $\times 10^4$, se muestra efecto positivo, lo cual nos da un mejor indicio del número real de células afectadas.

En la tabla IX, se muestran los resultados de la prueba estadística de X^2 de proporciones, en donde los resultados permiten rechazar las dos hipótesis, tanto la H_0 como la H_A para manchas chicas y totales, lo que evidencia un efecto débil positivo para este tipo de manchas; mientras que para manchas grandes se acepta la H_A y se rechazó la H_0 , presentando un efecto positivo general, debido a que es un mutágeno de acción directa y actúa en las primeras etapas de la división celular y con un menor efecto en las últimas etapas celulares, en donde actúa a través de sus metabolitos.

En la figura 17, se puede observar gráficamente la comparación de los tratamientos de los dos extractos con los controles positivo y negativo; en la cual se observa que el MMS presenta aproximadamente el doble de clones inducidos con respecto al control Sacarosa, en la mayoría de las manchas; en esta misma gráfica se observa que el número de clones con *B. satanoides* y *T. felleus* comparándolos con el MMS son aproximadamente la mitad del número de manchas inducidas por éste, sin embargo; *B. satanoides* tiene un efecto ligeramente mayor que *T. felleus*, al compararlos entre sí, mientras que en *B. satanoides* existe un frecuencia mayor para

manchas grandes que con el otro extracto, además de que esta frecuencia se acerca mucho a la del mutágeno de referencia.

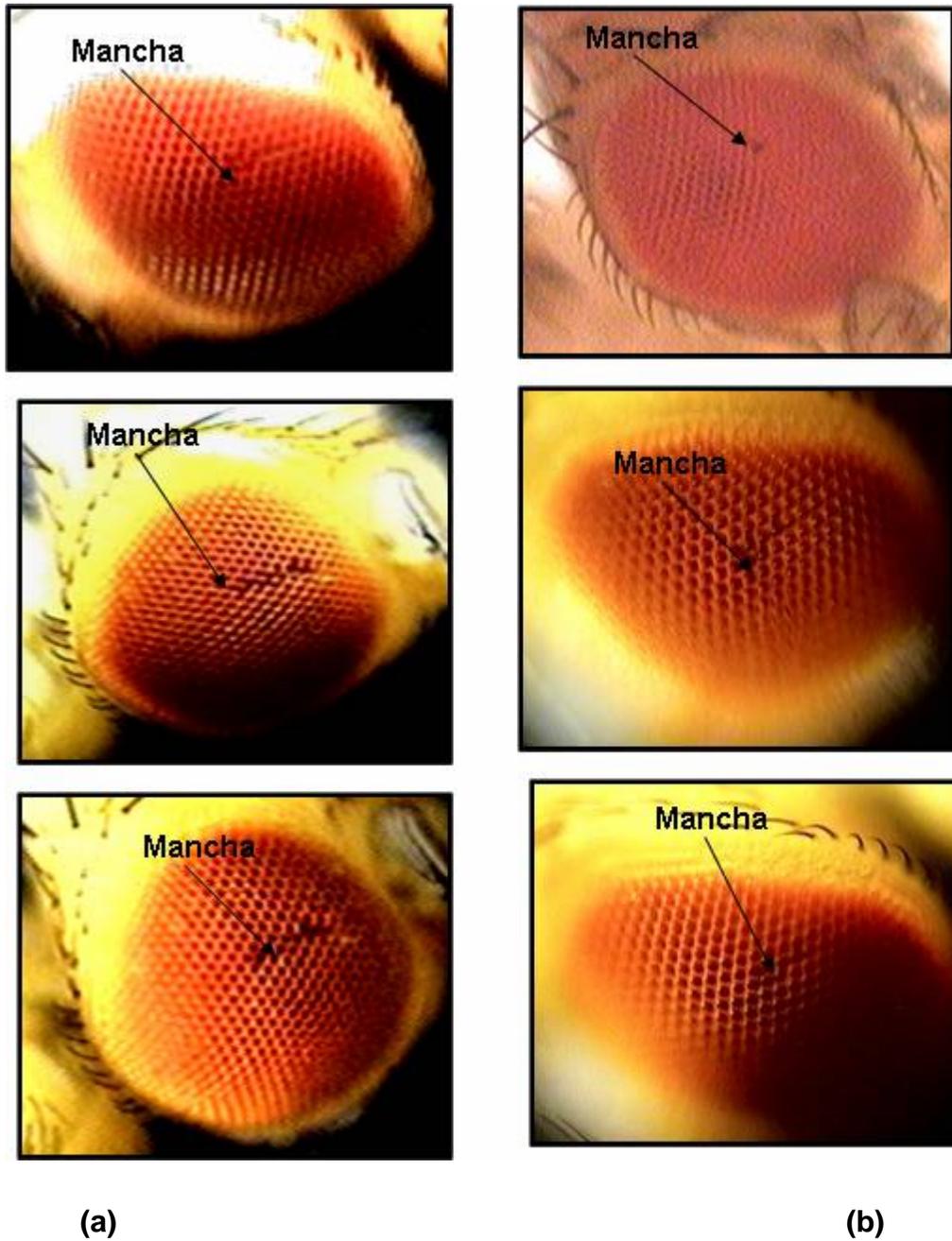


Figura 16. Manchas en ojos de *Drosophila melanogaster* inducidas con MMS (a) y Sacarosa al 5% (b)

Tabla IX. Resultados y diagnóstico de la prueba de X^2 con MMS comparados con Sacarosa

RESULTADOS DE LOS DATOS DE MANCHAS EN OJOS DE <i>Drosophila melanogaster</i> CON METIL METANOSULFONATO			
MANCHAS	MANCHAS TOTALES	MANCHAS CHICAS	MANCHAS GRANDES
n_o : manchas observadas en el control	62	53	9
n_t : manchas observadas en el tratamiento (MMS)	205	185	20
n: $n_o + n_t$	267	238	29
HIPÓTESIS NULA H_0			
p_o : frecuencia de manchas esperadas en el control	0.5	0.5	0.5
q_o : frecuencia de manchas esperadas en el tratamiento	0.5	0.5	0.5
$p_o n$: manchas esperadas en el control	133.5	119	14.5
$q_o n$: manchas esperadas en el tratamiento	133.5	119	14.5
PRUEBA DE CHI CUADRADA	76.59	67.21	4.21
CONCLUSIÓN H_0 ($\alpha = 0,05$)	RECHAZADA	RECHAZADA	RECHAZADA
HIPÓTESIS ALTERNIA H_A			
m : factor de multiplicación	2	2	5
p_A : frecuencia de manchas esperadas en el control	0.333	0.333	0.166
q_A : frecuencia de manchas esperadas en el tratamiento	0.666	0.666	0.833
$p_A n$: manchas esperadas en el control	88.91	79.25	9.66
$q_A n$: manchas esperadas en el tratamiento	177.82	158.5	24.16
PRUEBA DE CHI CUADRADA	12.6	13.29	3.73
CONCLUSIÓN H_A ($\beta = 0,05$)	RECHAZADA	RECHAZADA	ACEPTADA
DIAGNÓSTICO	DÉBIL POSITIVO (d)	DEBIL POSITIVO (d)	POSITIVO (+)

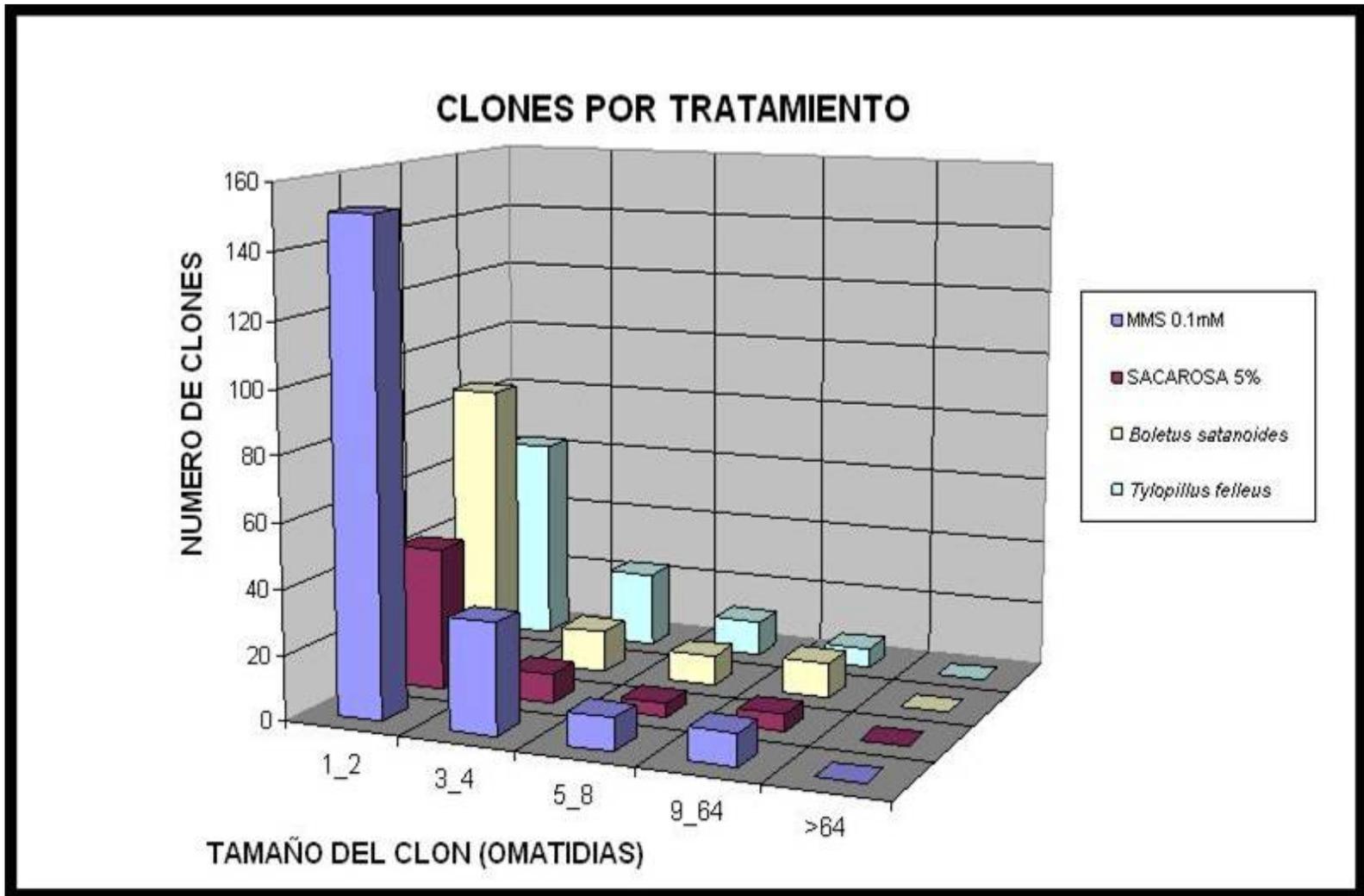


Figura 17. Número/tamaño de clones por tratamiento

5. DISCUSIÓN

Partiendo de los objetivos planteados y de la metodología propuesta, se seleccionaron dos especies de hongos *Boletaceos*, con base en los estudios etnomicológicos y en las encuestas realizadas en los municipios de Mineral del Chico y Zacualtipán, en el estado de Hidalgo. Dichos estudios, permitieron corroborar la presencia en las áreas de estudio de *Boletus satanoides* (Mineral del Chico) y *Tylopilus felleus* (Zacualtipán), así como su uso de manera tradicional en dichas comunidades en donde son reportados por su presencia y sus características tóxicas detectadas a través de su uso tradicional (García, 1999).

En la obtención de extractos ya sea de hongos o plantas, siempre se busca obtener la mayor cantidad de éstos y lo menos alterados posibles; para lo cual en el presente trabajo, se intentó realizar una modificación de la técnica reportada con la finalidad de conocer, si al dejar los hongos interactuar con el diluyente (metanol) por más tiempo antes de la destilación, se obtenía una mayor cantidad de éste para estudios posteriores de toxicidad y genotoxicidad, encontrándose que no influye en la cantidad de extracto obtenido, cuando el hongo estuvo o no expuesto al metanol previamente a la destilación (Domínguez, 1973; Valencia, 1995 y Brown *et al.*, 1998).

Con respecto a la toxicidad probada de los dos extractos; en ratas (*Rattus norvegicus*, cepa Winstar) y en moscas (*Drosophila melanogaster*), los resultados que se obtuvieron de estos análisis indican que en ratas no hubo algún efecto negativo, esto se puede deber a diversas variables como son; la vía de administración del extracto, la cantidad de extracto administrado, la edad de las ratas, la forma de administración del hongo, etc; por lo que se requieren realizar a

futuro más estudios con todas estas variables y con otros bioensayos que permitan realmente descartar su no toxicidad, lo cual permitirá ampliar el conocimiento de éstos y sus efectos sobre todo por su baja cantidad de reportes científicos. En el caso particular de *Drosophila*, en el presente trabajo; manifestó a las concentraciones y a las condiciones probadas un efecto tóxico; debido posiblemente a la susceptibilidad del organismo (Reyes y Almeida, 1992), asociado a la fracción microsomal equivalente a fracción S-9 de mamíferos que le permite metabolizar una gran cantidad de agentes químicos exógenos, lo que le confiere la capacidad de evaluar mutágenos, carcinógenos, y teratogénos de efecto directo e indirecto (Gaytán,1993), de ahí que sea recomendado para pruebas de genotoxicidad, en donde se ha comprobado que las diferentes opciones de respuesta metabólica (citotóxicidad) dependan de múltiples variables, como el bioensayo, la edad, el estado metabólico, la concentración y el tiempo de exposición, entre otros (Vega, 1985b); además es importante la evaluación en diferentes bioensayos como en este caso, que nos permiten descartar falsos positivos y negativos permitiendo establecer realmente a través de este y otros trabajos si hay o no un efecto tóxico y/o genotóxico.

Para el estudio de la genotoxicidad los resultados obtenidos indican que con el control positivo (MMS), se produce un efecto débil positivo en manchas chicas y totales, mientras que en manchas grandes ocasiona un efecto positivo, debido a la naturaleza del compuesto, sustentando los reportes bibliográficos como agente carcinógeno de acción directa (Index Merck, 1989), el cual no requiere ser biotransformado por el metabolismo del organismo y puede causar un daño temprano, produciendo así un número mayor de manchas grandes con respecto al

control (Frei y Würigler, 1988); reportándose que induce mutación y recombinación somática en alas, a las concentraciones de 0.1 mM y 1 mM de manera estadísticamente significativa, no encontrándose reportes en la prueba de ojo, por lo que el resultado encontrado en el presente trabajo, corrobora y amplía la información que se tiene de este compuesto al encontrarse que a la concentración 0.1 mM se indujo de manera significativa la inducción de clones celulares en ojo (Tabla VI y IX), lo cual valida el uso de este compuesto como un control positivo para los estudios de toxicidad y genotoxicidad, utilizado en *D. melanogaster*, además de ser un reporte nuevo que amplía el conocimiento de la toxicocinética del compuesto (Gaytán, 1993 y Muñoz, 1998).

Los resultados obtenidos para *B. satanoides*, muestran que hay un efecto genotóxico positivo para manchas chicas, grandes y totales, esto sugiere que el extracto de este hongo puede ser un compuesto genotóxico menos potente que el control positivo utilizado en el presente trabajo, que puede tener una acción ya sea directa o indirecta (Frei y Würigler, 1988), ampliando el conocimiento de los efectos directos en indirectos del consumo de este hongo, debido a que sólo hay reportes de toxicidad a corto plazo reportados, así como su clasificación como hongo venenoso o tóxico, produciendo el micetismo llamado “Síndrome gastrointestinal” (Bresinsky *et al.*, 1990; Díaz – Barriga, 1995 y García, 1999).

En cuanto a *T. felleus*; se obtuvieron resultados positivos para manchas chicas y totales, así como un resultado negativo para manchas grandes; lo que indica que el extracto de este hongo tiene un efecto indirecto debido a que la frecuencia de manchas chicas es mayor que la frecuencia de manchas grandes, esto quiere decir

que este hongo induce las manchas de manera tardía, en las últimas divisiones celulares, debido a que necesita ser metabolizado (Hernández, 1993 y Frei, 1994).

Snell y Dick (1970) así como Luciano (1985) reportaron a este hongo como un hongo de sabor amargo, razón por la cual no es comestible, por lo que la gente dice que es malo; por otro lado Bresinsky y Besl en 1990, lo reportan como un hongo tóxico, el cual produce el micetismo denominado “Síndrome gastrointestinal”.

Al igual que el hongo anterior, *T. felleus* presenta evidencia de un efecto genotóxico, por lo cual se amplía el conocimiento de efectos de corto plazo (micetismos) a efectos de largo plazo (genotóxicos), con la pequeña diferencia de que el primero hongo (*B. satanoides*) es de acción directa e indirecta y el segundo solo de acción indirecta (Bresinsky y Besl, 1990), la cual permite proponer un nuevo micetismo agregado a los ya establecidos, el cual puede producir daños al DNA y por lo tanto a largo plazo.

La actividad genotóxica observada en estos tratamientos *in vitro*, indica un potencial de efectos mutagénicos o carcinogénicos; lo cual se puede extrapolar como un potencial de riesgo en humanos (Li y Heflich, 1991), justificando la importancia del presente trabajo; además de que se generan nuevas líneas de investigación.

Por otro lado, la mayoría de los carcinógenos pueden ser detectados *in vitro* por medio de técnicas o pruebas de genotoxicidad, debido a que proveen evidencias útiles para identificar nuevos carcinógenos y mutágenos potenciales para los mamíferos y en especial para el hombre (Li y Heflich, 1991); aunado a que la Prueba de Mutación y Recombinación Somática (SMART) en ojo, es apropiada para predecir el riesgo de genotoxicidad en mamíferos (Graf *et al.*, 1994), debido a que no se puede experimentar directamente con el humano y que ha demostrado ser sensible y

eficiente para identificar compuestos genotóxicos de diversa naturaleza química (Frei, 1994).

No obstante, no podemos dejar de lado las otras razones por las que los hongos pueden ser tóxicos; debido a que no solamente el hongo como tal puede producir un daño, sino que existen diversas situaciones por las que pueden ser tóxicos o venenosos; algunas de ellas son: la edad del hongo, debido a que hay algunos hongos que cuando están en etapa adulta, producen algunas toxinas que causan algún micetismo; también, cuando se consume crudo es tóxico, pero cuando se cuece es inofensivo; por otra parte la toxicidad también puede ser inducida por el hábitat en donde se desarrolla el hongo, ya sea por la composición del sustrato o por lo que se encuentra alrededor de él, en muchas ocasiones las toxinas o esporas de otros hongos pueden llegar a ellos y al conjugarse con los compuestos originales de éstos, pueden producir algún efecto tóxico (Moore –Landecker, 1996).

Independientemente de que la mayoría de las intoxicaciones por hongos se deben a que muchos de los hongos tóxicos pueden ser confundidos como comestibles, y así darse una ingesta accidental (Moore – Landecker, 1996).

Es importante resaltar que en el presente trabajo, se sustentan las bases para estudios posteriores, que permitan conocer con exactitud el potencial tóxico y genotóxico de cada especie de hongo. Por otra parte, también hace falta reforzar estudios químicos, que permitan identificar las toxinas de muchos hongos que no han sido estudiados, así como sus efectos nocivos e incluso farmacéuticos en humanos.

6. CONCLUSIONES

Debido a que el presente trabajo tenía como principal objetivo evaluar con base en estudios etnomicológicos, los efectos tóxicos y genotóxicos de extractos metanólicos de hongos macromycetes, colectados en el estado de Hidalgo, México, para ampliar el conocimiento del uso y explotación de cada uno de estos hongos, así como para fomentar estudios que permitan valorar y validar el conocimiento tradicional de los recurso naturales, se puede concluir:

Primeramente, los extractos metanólicos de *Boletus satanoides* y *Tylopilus felleus*, presentan un efecto tóxico a la dilución probada (1:1), solo en el bioensayo de *Drosophila*, lo que permite evidenciar que posiblemente su toxicidad está relacionada con la capacidad metabólica del individuo, y por lo tanto se requiere evaluar en más bioensayos.

En cuanto a la genotoxicidad evaluada, se puede concluir que *Boletus satanoides* es un mutágeno débil tanto de acción directa como indirecta, debido a que induce de manera paralela tanto clones celulares chicos como grandes y con menor frecuencia que el mutágeno positivo.

De igual forma, *Tylopilus felleus* es un mutágeno débil, de acción indirecta, debido a que induce con mayor frecuencia clones celulares chicos, comparados con los grandes y también de menor frecuencia al mutágeno positivo.

Lo anterior es de importancia, debido a que revoluciona la forma de evaluar el potencial de riesgo asociado al consumo de hongos, de efectos a corto plazo denominados micetismos, en donde se evalúa las respuestas fisiológicas y tóxicas, a

efectos a largo plazo, en donde se evalúa el efecto en la siguiente generación (genotóxicidad).

En cuanto a la destilación por reflujo, se corroboró que es una buena técnica para la obtención de extractos metanólicos de diversos organismos vegetales, sin alteraciones químicas significativas, que se puede aplicar tanto en plantas como en hongos, sin requerir de la modificación propuesta en el presente trabajo.

Es de resaltar que este tipo de estudios depende de manera vital de la correcta identificación de los hongos; y que son fundamentales en el desarrollo económico y social de muchas comunidades que requieren nuevas fuentes de alimentación.

Por último, cabe recalcar que el presente trabajo, sustenta las bases para estudios posteriores que permitan conocer más sobre los efectos tóxicos, alimenticios y farmacéuticos de una gran cantidad de hongos macromycetes que en el estado de Hidalgo y en otras partes del mundo se utilizan desde hace mucho tiempo de manera tradicional por grupos indígenas.

ANEXO 1 Formato de entrevistas de hongos tóxicos.

CLAVE	<input type="text"/>	TÓXICOS		FOLIO	<input type="text"/>
NOMBRE INF.	<input type="text"/>				
FECHA	<input type="text"/>	EDAD	<input type="text"/>	SEXO	<input type="text"/>
DIR./COM.	<input type="text"/>				
ENTIDAD	<input type="text" value="HIDALGO"/>	MPIO.	<input type="text" value="MINERAL DEL CHICO"/>		
ORIGEN	<input type="text"/>				
NOM. CIENT.	<input type="text"/>				
NOMBRE(S) COMÚN (ES)	<input type="text"/>				
CAT. ANTROP.	COM-COMB-FORR-HERR-JUG-MAG-MED NARC-ORN-PERF-PES T-PIG-FERM-TOX-VEST				
FENOLOGÍA	<input type="text" value="E F M A M J J A S O N D"/>				
ASOCIAC.	<input type="text"/>				
SUSTRATO	<input type="text" value="TERR."/>	<input type="text" value="LIG."/>	<input type="text" value="HUM."/>	<input type="text" value="COP."/>	
				<input type="text" value="OT."/>	
CÓMO SABE	<input type="text"/>				
CARACT. DISTINT.	<input type="text"/>				
SÍNTOMAS	<input type="text"/>				
REMEDIO	<input type="text"/>				
ABUND.	<input type="text" value="MUCHO"/>	<input type="text" value="MODERADO"/>	<input type="text" value="ESCASO."/>		
OBSERVACIÓN:	<input type="text"/>				
UBICACIÓN H. H. V.	DISTINTIVO		<input type="text"/>		

7. LITERATURA CITADA

- Alexopoulos, C., Mims, C. y M. Blackwell, (1996). Introductory Mycology. Cuarta Edición. John Wiley & Sons, Inc. Estados Unidos de América. 868 p.
- Berlín, B; Breedlove, D. y P. Raven, (1974). Principles of Tzetzal Plant Classification. Academic Press. Nueva York. 384p.
- Bresinsky, A. y H. Besl, (1990). A Colour Atlas of Poisonous Fungi. Universitätsdruckerei Sürtz, Würzburg. Wolfw Publishing Ltd. Alemania. 295 p.
- Brown, T; LeMay, J. y B. Bursten (1998). Química. La Ciencia Central. Prentice Hall. Hispanoamericana. México. 991 p.
- Brusick, D. (1987).Principles of Genetic Toxicology. Segunda Edición. Hazleton Laboratorios. Plenum Press. New York – Londres. pp. 1 – 9.
- Butterworth, F. (1995). Introduction to Biomonitors and Biomarkers as Indicators of Environmental Change. En Environmental Science Research. Vol. 50 Plenum Press. New Cork. pp.1 – 7.
- Cifuentes, J; Villegas-Ríos, M. y L. Pérez. (1986). Hongos. En Manual de Herbario: Administración y manejo de colección. Técnicas de recolección y preparación de ejemplares botánicos. A. Lot; F. Chiang (eds). Consejo Nacional de la Flora de México, A. C. México, D. F. pp. 55 – 64.

- Deacon, J. (1988). Introducción a la Micología Moderna. Editorial Limusa S. A. de C. V. México, D. F. 350 p.
- De la Lanza, G. (2003). Criterios Generales Para la Elección de Bioindicadores. En: Organismos Indicadores de la Calidad del Agua y de la Contaminación. SEMARNAP, CNA, UNAM. México, D. F. pp. 3 – 32.
- Delgado, A. R. (1990). Daño Genético inducido por Mutágenos Positivos en Células del ala de *Drosophila melanogaster*. Tesis para obtener el título de bióloga. Universidad Autónoma de México. México, D. F. 74 p.
- Díaz–Barriga, H. (1995). Hongos Macromicetos Comestibles, Venenosos, Medicinales y destructores de la Madera de la Reserva de la Biosfera de la Mariposa Monarca, Sierra Chincua, Michoacán, México. Fundación Produce, Michoacán, A. C. México, D. F. 148 p.
- Domínguez, X. (1973). Aceites esenciales o esencial vegetales. En: Métodos de Investigación Fitoquímica. Editorial Limusa. México. pp. 229 – 239.
- Fernícola N. (1992a). Evaluación Biológica de la exposición humana. En: Toxicología Prospectiva y Seguridad Química. Programa Internacional de Seguridad de las sustancias Químicas. Centro Panamericano de Ecología Human y Salud. Programa de salud, Organización Mundial de la salud. México. pp. 23- 31.

- Fernícola N. (1992b). Nociones básicas de toxicología. En Toxicología Prospectiva y Seguridad Química. Programa Internacional de Seguridad de las sustancias Químicas. Centro Panamericano de Ecología Human y Salud. Programa de salud, Organización Mundial de la salud. México. pp. 1-8.
- Frei, H. y F. Würigler. (1988). Statistical Methods to Decide Whether Mutagenicity Test Data from Drosophila melanogaster Assays Indicate a Positive, Negative, or Inconclusive Result. En Mutation Research, 203: 297 - 208.
- Frei, H. (1994). Análisis Estadísticos de Datos Provenientes de las Pruebas de Mutación y Recombinación Somáticas (SMART). En Rev. Int. Contam. Ambient. Sup. 1. Vol. 10, 9-14.
- García-Jiménez, J., Pedraza KD., Silva Bl., Andrade, M. y T. Castillo. (1998). Hongos del Estado de Querétaro. Universidad Autónoma de Querétaro, México. 174 p.
- García, J. (1999). Estudio sobre la taxonomía, Ecología y Distribución de Algunos hongos de la familia Boletaceae (Basidiomycetes, Agaricales) de México. Tesis para obtener el grado de Maestría en Ciencias Forestales. Universidad Autónoma de Nuevo León. Linares, N. L. 335 p.
- Gaytán, J. (1993). Modulación del efecto genotóxico de la Mitomicina C (MMC) por las vitaminas A y C en células somáticas del ala en *Drosophila melanogaster*. Tesis para obtener el grado de Maestría en Ciencias

(Biología). Universidad Nacional Autónoma de México. México, D. F. 70 p.

Gaytán, O; Rojas, M; Iturbe, A; Ortiz, P; Hilgert, N; Moreno, H; Cabral, P; Acevedo, S; López, H; Sánchez, H; Goyenechea, M; Castellanos, S; Bravo, V. Y B. Palazuelos. (2004). Estudio de necesidades sociales de la Licenciatura en Biología. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. Pachuca, Hidalgo, México. 97p.

Gottschalk, W. (1984). Genética general. Editorial Reverté, S. A. España. 340 p.

Graf, U. (1994). La situación actual de SMART (Prueba de Mutación y Recombinación Somáticas) en *Drosophila melanogaster*. En: Rev. Int. Contam. Ambient. 10: 5-7.

Graf, U; Delgado-Rodríguez, A; Villalobos-Pietrini, R. y S. Gómez-Arroyo. (1994). Taller Latinoamericano de Genética Toxicológica. I. *Drosophila melanogaster*. En: Rev. Int. Contam. Ambient. 10: 1-4.

Hawksworth, C; Sutton, C. y C. Ainsworth. (2001). Dictionary of the fungi. Commonwealth Agricultural. Bureaux. Londres. 380 p.

Hernández, J. (1993). Relaciones Estructura Química – Actividad Genotóxica de 7 Compuestos en Células Somáticas de los Ojos de *Drosophila melanogaster* Utilizando cepas con o sin actividad Metabólica Incrementada. Tesis para obtener el grado de Biólogo. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D. F. 68 p.

- Hernández, H. (2007). Macromycetes de la región de Mineral del Chico, Hidalgo: aportación a la etnomicología. Tesis para obtener el título de Licenciado en Biología. Hidalgo. México. 90 p.
- Hoiland, K. (1987). A New Approach the Phylogeny of the Order *Boletales* (*Basidiomycotina*). Nord, J. Bot. 7: 705 – 718.
- Houdou, G. (2001). El Mundo de las Setas. Ultramar Editores, S. 0A. Barcelona. 144p.
- Index Merck (1989). Encyclopedia of chemical and drugs. 11 Ed. Publish by Merck and Co; Inc. Rahway, N. J; U.S.A. 1606 p.
- Klug, S. y R. Cummings (1999). Conceptos de Genética. Quinta Edición. Prentice Hall Iberia, S. R. L. Madrid. 814p.
- Largent, D; Johnson, D. y R. Watling. (1973). How to identify mushrooms to genus III: Microscopic Features. E. U. pp. 1 – 113.
- Lawrence, P. (1992). The Making of a Fly. The genetics of Animal. Design. Mcr Laboratory of Molecular Biology. Editorial Offices Blackwell Science Ltd. Hill Road Cambridge. E. U. pp. 180 – 192.
- Li, A. Y A, Heflich. (1991). Genetic Toxicology. CRC Press. Inc. Boca Raton Ann Arbor Boston. Estados Unidos. pp. 1 – 7.
- Lindsley, D y G. Zimm (1992). The Genome of *Drosophila melanogaster*. Academic Press, Inc. Estados Unidos. 1133 p.

- Luciano, C. (1985). Boletus D'LL. ex L. (sensu lato). Librería editrice Biella Giovanna. Italia. 697 p.
- Montoya, A. (1997). Estudio Etnomicológico en San Francisco Temezontla, Estado de Tlaxcala. Tesis para obtener el grado Académico de Maestro en Ciencias (Biología Vegetal). Facultad de Ciencias UNAM. México, D. F. 132 p.
- Moore – Landecker, E. (1996). Fundamentals of the Fungi. Cuarta Edición. Prentice - Hall, Inc. Estados Unidos de América. 574 p.
- Moreno-Fuentes, A., Garibay-Orijel, R., Tovar-Velasco, Y JA. Cifuentes (2001). “Situación actual de la etnomicología en México y el Mundo”, en Etnobiología 1:75-84, 2001. Facultad de Ciencias de la UNAM, México, D. F. pp.75-83.
- Muñoz, J. (1994). Caracterización del potencial genotóxico y protector de *Ipomoea orizabensis*, en células somáticas de *Drosophila melanogaster*. Tesis para obtener el grado de Lic. En Biología. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D. F. 65 p.
- Muñoz, J. (1998). Comparación de la genotoxicidad de la resina obtenida de la raíz de tres especies del genero *Ipomoea*: *I. orizabensis*, *I. jalapa* e *I. purga*, mediante la prueba de mutación y recombinación somáticas de *D. melanogaster*. Tesis para obtener el grado de Maestro en Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D. F. 151 p.

- Ordaz, M. (1998). Caracterización de la actividad genotóxica del Aminoácido Azufrado Taurina y algunos antagonistas mediante el empleo de células somáticas de *Drosophila melanogaster*. Tesis para obtener el grado de Maestro en Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D. F. 110 p.
- Pérez-Silva, E y T. Herrera. (1991). Iconografía de macromicetos de México. I *Amanita*. Publicaciones especiales del Instituto de Biología 6. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D. F. 133 p.
- Phillips, O. y A. H. Gentry, (1993). The Useful of Tambopata, Perú: I. Statistical hypotheses test with a New Quantitative Technique Economic. Botany 47 (1): 15-32.
- Ramos, P; Abundis, H; Gaytán, J. C; Ordaz, M. G; Orozco, P. G; Maldonado, J; Hernández, J; González, E; Reyes, P; Galicia, E. M. y Muñoz, J. A. (1993). Manual de Laboratorio de Genética para *Drosophila melanogaster*. Mc Graw- Hill Interamericana de México, S. A de C. V. México, D.F. 132 p.
- Reyes, F y F. Almeida (1992). Toxicología Prospectiva y Seguridad Química. Programa Internacional de seguridad de las Sustancias químicas. Organización Mundial de la Salud. México. 231 p.

- Rodríguez, E; Rodríguez, C; Ramírez, A; Caballero. P; Bazaldúa, J; Bautista, E; Romero, L. Y A. Moreno. (2003). Contribución al estudio etnomicológico en diversas regiones del estado de Hidalgo. VIII Congreso Nacional de Micología. Toluca, Estado de México.
- Rodríguez, E. C. (2007). Taxonomía de la Familia Boletaceae sensu Hawksworth (2001), en los bosques templados de la Mojonera, Zacualtipán, Hidalgo, México. Tesis para obtener el título de Licenciado en Biología. Hidalgo, México. 160 p.
- Romero, L. (1996). La diversidad de los hongos en el Estado de Hidalgo. Inifap Produce, Fundación Hidalguense Produce A. C, UAEH. Hidalgo, México. pp. 1 – 5.
- Romero, L. (2002). Aislamiento, caracterización y evolución del potencial de cultivo de *Pleurotus opuntiae* (Dur &Lév.) Sacc. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias, UNAM, D. F. 150 p.
- Ruiz, D., Tay, J., Sánchez, J. y H. Martínez. (1999). Los micetismos y su relevancia en medicina. Revista Iberoamericana de Micología, 16: 121 – 125.
- Russell, H. (1989). Research Methods in Cultural Anthropology. SAGE. Publications. Newbury Park. 436 p.
- Snell, W. y E. Dick. (1970). The Boleti of Northeastern North América. Editorial Verlag Von J. Cramer. Alemania. pp. 9, 14, 90, 91.

- Timbrell, J. (1989). Introduction to Toxicology. Editorial Taylor & Francis. USA. 155 p.
- Valencia, O. (1995). Constituyentes Secundarios de las Plantas. En: Fundamentos de Fitoquímica. Editorial Trillas, S. A. de C. V. México, D. F. pp. 11-30.
- Vega, S. (1985a). Toxicología I: Cinética y Efectos de los Contaminantes Tóxicos Del Ambiente. En: Evaluación Epidemiológica de Riesgo causados por agentes químicos ambientales. Ed. Centro Panamericano de Ecología humana y Salud. Organización Panamericana de la Salud y la organización Mundial de la Salud. México. pp. 1 -16.
- Vega, S. (1985b). Toxicología II: Toxicocinética en: Evaluación Epidemiológica de Riesgo causados por agentes químicos ambientales. Ed. Centro Panamericano de Ecología humana y Salud. Organización Panamericana de la Salud y la organización Mundial de la Salud. México. 41p.
- Vettorazzi G. (1992). Toxicología Prospectiva, Base Lógica, Manera de Abordar y Aplicaciones Practicas. En: Toxicología Prospectiva y Seguridad Química. Eds. Reyes, F y F. Almeida. Programa Internacional de Seguridad de las Sustancias Químicas. Organización Mundial de la Salud. Ginebra, Suiza. pp. 9 – 22.

Villaseñor, L. (1998). Los hongos y la cultura indígena. En Boletín Informativo. Intercambio Académico Núm. 104. Noviembre 1998. Universidad Nacional Autónoma de México. pp. 10.

Vogel, E. (1985). Genotoxic Chemical and Introduction into Basic Principles of Genetic Toxicology. Ed. Universidad Suiza. pp. 2 - 4.

Vogel, E. (1987). Somatic Mutation and Recombination Test SMART in *Drosophila melanogaster*. The w/ w+ eye mosaic technique: Description of its basic application. Department Of. Radiation genetics and chemical mutagenesis. Sylvius Laboratory. Leiden. 21 p.

Wasson, G. (1993). El hongo maravilloso teonanácatl. Micolatría en Mesoamérica. FCE. México, D. F. 120 p.

http://biology.kenyon.edu/courses/biol114/Chap12/Chapter_12b2.html

Kuo, M. (2001, September). *Tylopilus felleus*. Recuperado de *MushroomExpert.Com*.

Web site:

http://www.mushroomexpert.com/tylopilus_felleus.html

www.healthynebraska.com/fruitfly.gif.