



10524
39

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN

ESTUDIO DE LA ACCION ANTICLASTOGENICA DEL
CUACHALALATE (*amphipterygium adstringens*)
SOBRE LA INDUCCION DE MICRONUCLEOS
PRODUCIDOS POR IFOSFAMIDA.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

T E S I S

PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA
P R E S E N T A N :
ERENDIRA MARTINEZ RICO
GUADALUPE FLORES REYES

DIRECTORA: M. EN C. SANDRA DIAZ BARRIGA ARCEO



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas

Tesis Digitales

Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©

PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN
UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES

LEGISLACION NACIONAL
 AVENIDA 10
 ALZAR

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

DR. JUAN ANTONIO MONTARAZ CRESPO
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN
P R E S E N T E

ATN: Q. Ma. del Carmen García Mijares
 Jefe del Departamento de Exámenes
 Profesionales de la FES Cuautitlán

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la TESIS:

"Estudio de la acción anticlastogénica del Cuachalalate
(Amphinterygium adstrincens) sobre la inducción de
miconúcleos producidos por ifosfamida"

que presenta la pasante: Eréndira Martínez Rico
 con número de cuenta: 911440-2 para obtener el título de :
Química Farmacéutica Bióloga

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

A T E N T A M E N T E

"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 16 de Enero del 2003

PRESIDENTE C.F.B. Maricela Noe Martínez *supleniente que*
 LOCAL M. en C. Luisa Martínez Aguilar *75.0*
 SECRETARIO M. en C. Sandra Díaz Barriga Arceo *75.0*
 PRIMER SUPLENTE C.F.B. Rosalba Bonilla Sánchez *Rosalba*
 SEGUNDO SUPLENTE M. en C. Rosa Inés Álvarez González

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

B



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
UNIDAD DE LA ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

DR. JUAN ANTONIO MONTARAZ CRESPO
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
P R E S E N T E

ATN: Q. Ma. del Carmen García Mijares
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la FES Cuautitlán

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la TESIS:

"Estudio de la acción anticlastorónica del cunchalalate
(Amphintervium adstricens) sobre la inducción de
micronúcleos producidos por ifosfamida"

que presenta la pasante: Guadalupe Flores Reyes
con número de cuenta: 09754040-3 para obtener el título de:
Química Farmacéutica Bióloga

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

A T E N T A M E N T E

"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 16 de Enero del 2003

PRESIDENTE Q.F.R. Maricela Noe Martínez
VOCAL M. en C. Luisa Martínez Aguilar
SECRETARIO M. en C. Sandra Díaz Barrios Arceo
PRIMER SUPLENTE Q.F.R. Rosalba Bonilla Sánchez
SEGUNDO SUPLENTE M. en C. Rosa Isela Alvarez González

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

C

AGRADECIMIENTOS Y DEDICATORIAS

A Dios por todo lo que me ha dado y ha permitido ser y hacer
A mis padres y hermanos porque gracias a ellos soy lo que soy
Eréndira.

A mi mamá por su apoyo y amor, a mis hermanos, a mis sobrinos, con mucho
cariño

A Dios que me ha permitido llegar a este momento y por todas las bendiciones
que me ha dado

Guadalupe.

Le agradecemos de manera especial a la Dra. Sandra, nuestra directora de
Tesis, por todo su apoyo, dedicación y confianza.

Así como a las personas que colaboraron en la realización de este trabajo: Dr.
Enrique Angeles A., Dr. Mariano Martínez V..

A los sinodales por la atención y los consejos brindados.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

RESUMEN

Estudio de la acción anticlastogénica del Cuachalalate (*Amphipterygium adstringens*) sobre la inducción de micronúcleos producidos por ifosfamida

La corteza del cuachalalate (*Amphipterygium adstringens*) ha sido utilizada tradicionalmente en México para tratar los problemas del tracto digestivo, incluso el cáncer de estómago. Tal actividad se le ha atribuido a los ácidos masticadienónico y 3 α -hidroximasticadienónico. Son escasos los estudios formales acerca de su actividad anticancerígena, por lo que el objetivo de esta investigación fue probar que el extracto hexánico del cuachalalate disminuye el número de micronúcleos inducidos por ifosfamida.

Para lo cual, se utilizó un extracto hexánico de cuachalalate en el que se comprobó la presencia de los ácidos masticadienónico y 3 α -hidroximasticadienónico mediante una cromatografía en capa fina. En la experimentación se utilizaron ratones machos cepa CD1, los que se dividieron en 6 lotes de 5 animales cada uno. Los lotes 1 y 2 fueron el testigo negativo y positivo respectivamente, el lote 6 sirvió para investigar el comportamiento del extracto solo, los lotes 3, 4 y 5 fueron tratados con ifosfamida y el extracto en dosis de 500, 1000 y 1500 mg/kg respectivamente, por vía oral y en una sola administración. Se tomaron muestras de sangre periférica de la cola de cada uno de los animales a las 0, 24, 48 y 72 horas post-administración, para realizar los frotis que posteriormente se analizaron en el microscopio. El número de micronúcleos inducidos por la ifosfamida fue considerado como el 100 % de mutagenicidad, partiendo de éste hecho, se determinó el grado de inhibición de micronúcleos que produjo el extracto hexánico del cuachalalate, obteniendo valores del 44 al 90 % de inhibición, determinándose que la dosis que provoca mayor efecto genoprotector es la de

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

1500 mg/kg del extracto, siendo los resultados estadísticamente significativos ($p < 0.05$). En cuanto a la citotoxicidad los resultados obtenidos mostraron que el extracto solo no es citotóxico, pero que en combinación con la ifosfamida se presenta un efecto sinérgico, por lo que el efecto citotóxico fue mayor.

I. ABREVIATURAS

ADN	Ácido Desoxirribonucleico
ENC	Eritrocitos Normocrómicos
EPC	Eritrocitos Policromáticos
EPC MN	Eritrocitos Policromáticos Micronucleados
EXT	Extracto hexánico del Cuachalalate
Hsp	Proteínas de choque térmico
IFF	Ifosfamida
MN	Micronúcleos
OMS	Organización Mundial de la Salud
SEMARNAP	Secretaría del Medio Ambiente, Recursos Naturales y Pesca
UV	Ultravioleta
ICH	Intercambio de Cromátides Hermanas

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

II. ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. Árbol de cuachalalate	9
FIGURA 2. Corteza de Cuachalalate	9
FIGURA 3. Estructuras químicas propuestas para los compuestos extraídos de <i>Amphipterygium adstringens</i>	14
FIGURA 4. Esqueletos básicos de los diferentes grupos de triterpenos	15
FIGURA 5. Estructura de la ifosfamida	18
FIGURA 6. Mecanismo de acción de agentes alquilantes	20
FIGURA 7. Mecanismo de inducción de micronúcleos	23
FIGURA 8. Diagrama de flujo	30
FIGURA 9. Ensayo de micronúcleos	31
FIGURA 10. Corrimiento Electroforético	32
FIGURA 11. Frecuencia de EPC MN del testigo negativo	34
FIGURA 12. Frecuencia de EPC del testigo negativo	35
FIGURA 13. Frecuencia de EPC MN del testigo positivo	36
FIGURA 14. Frecuencia de EPC del testigo positivo	37
FIGURA 15. Frecuencia de EPC MN del EXT + IFF	39
FIGURA 16. Grado de inhibición	40
FIGURA 17. Frecuencia de EPC del EXT + IFF	42
FIGURA 18. Frecuencia de EPCMN del extracto	43
FIGURA 19. Frecuencia de EPC del extracto	44

III. GENERALIDADES

Capítulo 1. La Herbolaria

El hombre desde sus orígenes ha dependido de las plantas que lo rodean para cubrir sus necesidades básicas como el alimento, el vestido, la recuperación y el mantenimiento de la salud.

La herbolaria, como se conoce a la práctica terapéutica que utiliza plantas medicinales, continúa vigente y tiene gran arraigo en nuestro país. Las plantas medicinales aún constituyen el recurso más conocido y accesible para grandes núcleos de la población mexicana. La OMS reconoce el valor de esta práctica terapéutica y le otorga gran importancia en los esquemas públicos para la salud [Betancourt, 2001].

En México, la utilización de plantas como remedios para la salud física y espiritual tiene sus orígenes en varias culturas prehispánicas. Existen evidencias arqueológicas directas como las encontradas en las cuevas de Tehuacán, por mencionar alguna, que mostraron la presencia de botones florales de *Plumeria rubra* variedad *acatifolia* (flor de mayo) y las semillas de *Thevetia peruviana* (venenillo) quienes, además de utilizarse en un contexto ceremonial fueron empleadas para sanar diversos padecimientos [Bye y Linares, 1999]. Durante la época colonial se elaboró en México un manuscrito con dibujos a color de cerca de 150 plantas medicinales autóctonas, las cuales se acompañan de textos en latín sobre sus usos y propiedades curativas. El médico indígena Martín de la Cruz y Juan Badiano, un joven alumno del Colegio de la Santa Cruz de Tlatelolco, fueron los encargados de dar forma a este libro, redescubierto hasta el siglo XX y que fue llamado Códice de la Cruz – Badiano [Lozoya, 1999].



Actualmente, se han registrado en nuestro país alrededor de 4000 especies con atributos medicinales (15 % de la flora total), este número coincide con lo informado en varias regiones del mundo por especialistas en la materia, quienes consideran que una de cada siete especies posee alguna propiedad curativa. Sin embargo, se calcula que en México, y en todo el mundo, la validación química, farmacológica y biomédica sólo se ha llevado a cabo en aproximadamente 5 % de estas especies [Betancourt, 2001].

El valor de las plantas medicinales está dado por sus constituyentes químicos, generalmente sus metabolitos secundarios son responsables de los efectos fisiológicos que producen. Los alcaloides, terpenoides, glicósidos, flavonoides y lignanos son algunas de las familias de compuestos con actividad biológica demostrada.

El uso de las plantas medicinales representa ciertas ventajas, por ejemplo al compararlas con los tratamientos químicos. En las plantas los principios activos se encuentran biológicamente equilibrados por la presencia de sustancias complementarias que van a potenciarse entre sí, de forma que en general, no se acumulan en el organismo, y sus efectos indeseables están limitados.

Dentro de una planta pueden coexistir varios principios activos que probablemente tienen una acción distinta a la que tendrían de manera separada; se puede decir en este caso, que el todo no es igual a la suma de las partes, e incluso sus efectos terapéuticos pueden ser más, menos o radicalmente distintos. De tal manera que entre estos componentes existen interrelaciones que producen potenciación o antagonismo, dando como resultado una acción conjunta. Este hecho hace muy complicado el estudio de una planta [pág. web, fitoterapia. 2001].

En los últimos 15 años el comercio mundial de las plantas medicinales se ha incrementado y dentro de los factores que han contribuido a que la población mexicana siga haciendo uso de la medicina tradicional son principalmente: a) la

carencia y/o deficiencia de servicios de salud pública tales como hospitales y atención médica, b) el deterioro económico aunado a c) el incremento en el costo de las medicinas de patente.

La mayoría de las plantas medicinales que se comercializan en México son especies silvestres. Sin embargo no existe un control de calidad para el procesamiento, almacenamiento, empaquetado y distribución de las plantas medicinales, de manera que algunas especies se adulteran, tal es el caso de *Amphipterygium adstringens* que se mezcla con *Cytocarpa procera* y con *Comocladia mollissima*. Ambas plantas son parecidas a *Amphipterygium adstringens* en morfología y en características anatómicas, presentan canales resiníferos, además de que contienen flavonoides muy parecidos. [Rosas, 2000].

Por otro lado, algunas especies vegetales han sido utilizadas en el tratamiento de enfermedades malignas durante siglos, pero la búsqueda de productos naturales con actividad antineoplásica de uso clínico ha dado resultados pobres. Entre las plantas, cuyo efecto antineoplásico ha sido satisfactorio se encuentra el podofilo (*Podophyllum hexandrum*), utilizado desde hace más de 2000 años por los chinos como fármaco antitumoral, del cual se han aislado diversos lignanos así como sus heterósidos que poseen actividad antitumoral. Además, en ensayos clínicos dos derivados semisintéticos han dado mejores resultados, uno de ellos es el llamado etopósido, que se usa frecuentemente en el tratamiento de cáncer de pulmón y testicular [Trease y Evans, 1987].

Otro caso lo constituye el colchico (*Colchicum autumnale*) del que se obtiene la colchicina y otros alcaloides. La colchicina es utilizada como inhibidor mitótico, lo cual tiene como consecuencia la inhibición de la división celular y por lo tanto disminuye la formación o el crecimiento de tumores, se ha utilizado con gran éxito como fármaco antineoplásico [Trease y Evans, 1987].

La vinblastina y la vincristina, son alcaloides obtenidos de *Catharanthus roseus* y se utilizan ampliamente en la quimioterapia del cáncer, sobre todo en las leucemias.

Así mismo, los extractos crudos de la corteza del Tejo del Pacífico (*Taxus brevifolia*) muestran actividad citotóxica contra células leucémicas y acción inhibitoria contra una gran variedad de tumores en ratones. De la corteza se aisló un pseudoalcaloide diterpénico llamado Taxol, que es el principio activo [Trease y Evans, 1987]. El uso clínico del Taxol fue aprobado en 1995 por la FDA [pág. Web, Taxol. 2002].

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Capítulo 2. El Cuachalalate

En México *Amphipterygium adstringens* es conocida comúnmente con los nombres de chalalate, cuachalalate, cuachalala y volador en Puebla; en el DF se conoce como cuachalalatl, maceran y matixeran; en Michoacán pacueco y en Oaxaca como cuachinala.

El nombre cuachalalate proviene de la etimología náhuatl Cuachalalatl: árbol de la chachalaca del náhuatl Cuautl – chachalaca, que hace referencia a la chachalaca, un ave de nombre científico *Ortalis poliocephala*, que gusta de comer los frutos y semillas del cuachalalate [Álvarez, 1998; pág. Web A adstringens, 2002.] .

Amphipterygium adstringens es un árbol dióico de aproximadamente 5 – 10 metros de altura y 40 centímetros de diámetro, con el tronco torcido, de corteza color moreno grisáceo o gris plumizo con grandes escamas, con hojas opuestas, oblongas u oblongo – lanceoladas de 6 a 15 cm, agrupadas en las puntas de las ramas en número de 3 a 5, en el haz son de color verde opaco y en el envés verde grisáceo [Martínez, 1991]. (FIGURA 1)

Este árbol se localiza en la vertiente del Pacífico desde Nayarit hasta Oaxaca y en Puebla, Morelos y el Estado de México [pág. web, fitoterapia. 2001; Martínez, 1991]. En varios estados de la República se menciona el uso de la corteza del cuachalalate (FIGURA 2) principalmente en forma de cocimiento, para tratar úlceras, lesiones cutáneas, la tifoidea, dolor de muelas, fuegos en la boca, estomatitis, cáncer de estómago, gastritis, trastornos gastrointestinales, fiebres intermitentes, paludismo, fiebre, manchas en la piel, granos, flujo vaginal, caída de la matriz y ovarios, infecciones vaginales, problemas bucales, para endurecer las encías, para la inflamación del riñón, para la circulación sanguínea, para várices y úlceras varicosas, gangrena; además tiene efectos analgésicos contra el dolor de cintura,

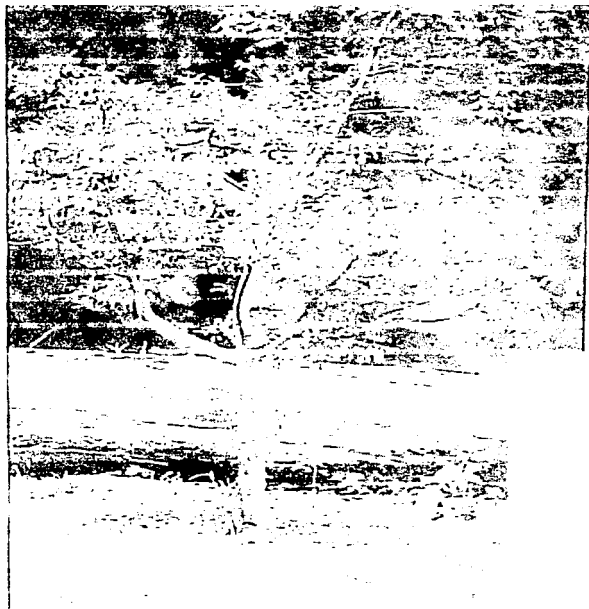


Figura 1 Árbol de Cuachalalate



Figura 2. Corteza De Cuachalalate

cabeza, espalda, pulmones, hernia, reuma o punzadas y también como antidiabético [Betancourt, 2001].

Los estudios químicos realizados por Navarrete, (1982) permitieron el aislamiento y caracterización de dos principios biodinámicos: el ácido 3 α -dihidroxi-masticadienónico y el ácido masticadienónico. Esta investigación consistió en realizar extracciones con hexano y acetona a reflujo, posteriormente a los productos obtenidos se les realizaron cromatografías y se procedió a su identificación por medio de resonancia magnética nuclear, infrarrojo y espectrometría de masas, entre otras.

Martínez y col, (1999) realizaron un estudio con la finalidad de compilar información botánica, química y farmacológica de la planta, obtuvieron como resultado que los ácidos antes mencionados, se acumulan más en las plantas hembra que en las macho y que la mayor cantidad de ácido masticadienónico se encuentra presente en el mes de febrero mientras que el ácido 3 α -dihidroxi-masticadienónico se encuentra en mayor cantidad en el mes de noviembre.

A partir de estos descubrimientos, se han realizado diversas investigaciones químicas sobre la planta, donde se ha logrado identificar que en la corteza del árbol se encuentran los triterpenos ácido 3 α y 3-epi-masticadienónico, isomasticadienónico y epi-oleanólico; los compuestos fenólicos ácido 6-heptadecilsalicílico, 6-nonadecilsalicílico y 6-pentadecilsalicílico; y el esteroide β -sitosterol. También se han aislado los triterpenos: ácido instiopolinásico [Dominguez y col., 1983.] oleanólico, masticadienónico, 3 α -dihidroxi-masticadienónico [Navarrete, 1982], una mezcla de ácidos anarcárdicos y aldehídos fenólicos [Navarrete y col., 1982]. En las hojas se ha identificado el ácido cuachalalílico, el cual es un triterpeno [Papageorgiou y col., 1997]. Además de fenoles de cadena larga descubiertos por Mata y col., en 1991.

Aunque no esta totalmente confirmado químicamente, se piensa que puede existir un ácido nuevo, el ácido 1, 8 - dihidroxi -3- dodecil - 2- naftoico el cual

constituiría un producto natural novedoso, ya que sería el primer derivado de tipo alquilnaftaleno que se describe en la naturaleza [pág. Web, Constit. adic. de *A. adstringens*, 2002]. (FIGURA 3)

Triterpenoides

Los triterpenoides son compuestos que están ampliamente difundidos en el reino vegetal, como glucósidos, ésteres o libres, están formados por la unión virtual de 6 unidades de isopreno. Se designa como triterpenos a los productos naturales que tienen más de 30 átomos de carbono y una estructura que se deriva de 6 unidades de isopreno. (FIGURA 4)

Algunos triterpenoides desempeñan un papel importante dentro de la interacción planta – herbívoro, tal es el caso de las cucurbitacinas, cuasinoides, limonoides, saponinas, cardonólicas. La presencia de estos compuestos generalmente es interpretada como un mecanismo de defensa de la planta contra depredadores.

Los triterpenos del cuachalalate son triterpenoides tetracíclicos, que forman un numeroso grupo de productos naturales; los cuales se dividen en varios subgrupos de acuerdo con algunas variaciones del esqueleto, los principales son los siguientes: Escualeno, Fusidano – Lanostano, Damarano – Eufano (en el cual se encuentran los ácidos masticadienónico e iso- masticadienónico del cuachalalate) [Barton y Seoane, 1956].

Diversas investigaciones se han realizado en cuanto a la farmacología de los componentes de la planta y se ha comprobado que el cuachalalate tiene acción hipocolesterolémica, además tiene acción antiinflamatoria pues disminuye el edema generalizado hasta en un 93 % [Navarrete y col., 1982; Martínez, 1999].

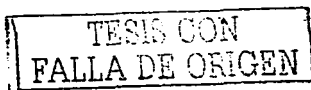
Estudios posteriores analizaron las propiedades gastroprotectoras del ácido mástico (que contiene al ácido masticadienónico y 3 α - dihidroximasticadienónico) en ratones tratados con indometacina, fármaco antiinflamatorio no esteroideo que daña al tracto gastrointestinal. Los resultados indican que el ácido mástico disminuye el grado de absorción de la indometacina y que además protege el tracto gastrointestinal del efecto dañino de la indometacina [Gabr, 1991].

El efecto antiulceroso del cuachalalate ha sido comprobado por diversos investigadores en distintos años [Navarrete y col., 1990]. Sin embargo, cabe mencionar que en cuanto a su acción anticancerígena, las investigaciones formales son escasas, no obstante que en 1962 se estudió la posible actividad antitumoral de la corteza del cuachalalate, al someter a ratones con adenocarcinoma mamario a tratamientos con los extractos metanólicos de esta planta. De acuerdo con este trabajo la actividad anticancerígena puede ser debida a la presencia de una saponina esteroideal, cuya genina fue identificada como sarsapogenina, en base a varias cromatografías en papel y su espectro infrarrojo [González y col., 1962].

Estos resultados ahora se sabe son erróneos ya que no se ha identificado ninguna saponina en la corteza del cuachalalate, pero se explica tal confusión ya que los ácidos triterpénicos tienen un esqueleto similar a las saponinas.

Además, existen otras publicaciones donde se propone que el ácido masticadienónico aislado y otras especies químicas son los responsables de la actividad biológica de la planta o corteza. Hasta hace algunos meses se dio a conocer la noticia acerca de un estudio *in vivo* en ratones, en donde un grupo de investigadores observaron que el cuachalalate logró disminuir el cáncer de estómago en los ratones [Cruz, 2001].

Como en el caso del cuachalalate, el estudio de plantas con características antimutagénicas y anticarcinogénicas, ha aumentado en las últimas fechas, debido al interés que se tiene en obtener nuevos fármacos capaces de eliminar o disminuir los



diferentes tipos de cánceres que existen, sin que se presenten reacciones secundarias como con los fármacos existentes en el mercado.

Un objetivo similar se busca al estudiar plantas con actividad antimutagénica, es decir, se busca efectividad, con las menos reacciones secundarias posibles.

Un ejemplo de un antimutágeno proveniente de una planta, es el ácido nordihidroguayaretico, que es un derivado semisintético del exudado resinoso de *Larrea divaricata* y *Larrea tridentata* cuya capacidad antimutagénica se evaluó por las técnicas de MN e ICH [Márquez, 1997; Madrigal-Bujaidar y col., 1998; Díaz-Barriga y col., 1999]. Otro ejemplo lo constituye el gordolobo, cuyo extracto acuoso demostró que tiene capacidad antimutágena al enfrentarlo a la daunorrubicina, evaluado por la técnica de ICH [Luna, 1999].

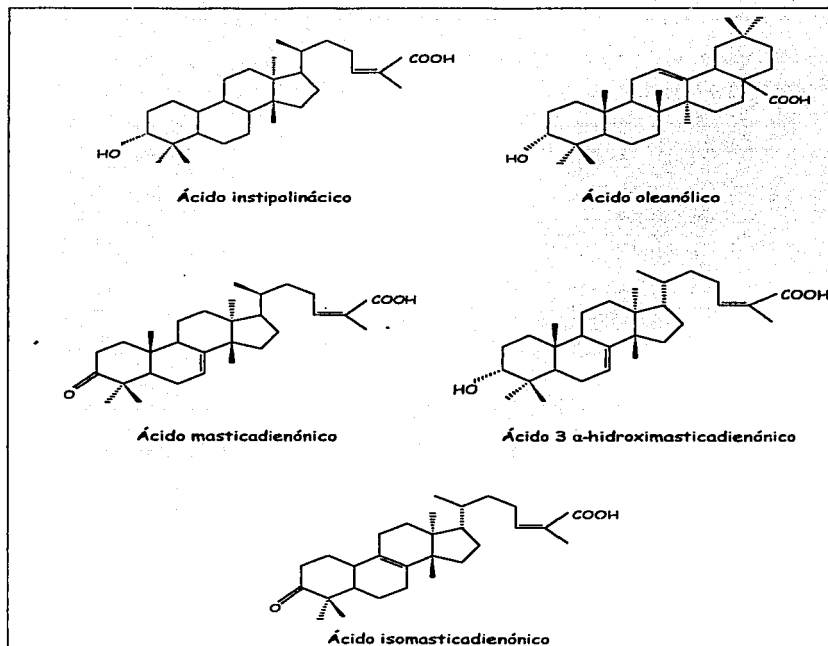


Figura 3. Estructuras químicas propuestas para los compuestos extraídos de *Amphipterygium adstringens* [Rosas, 2000].

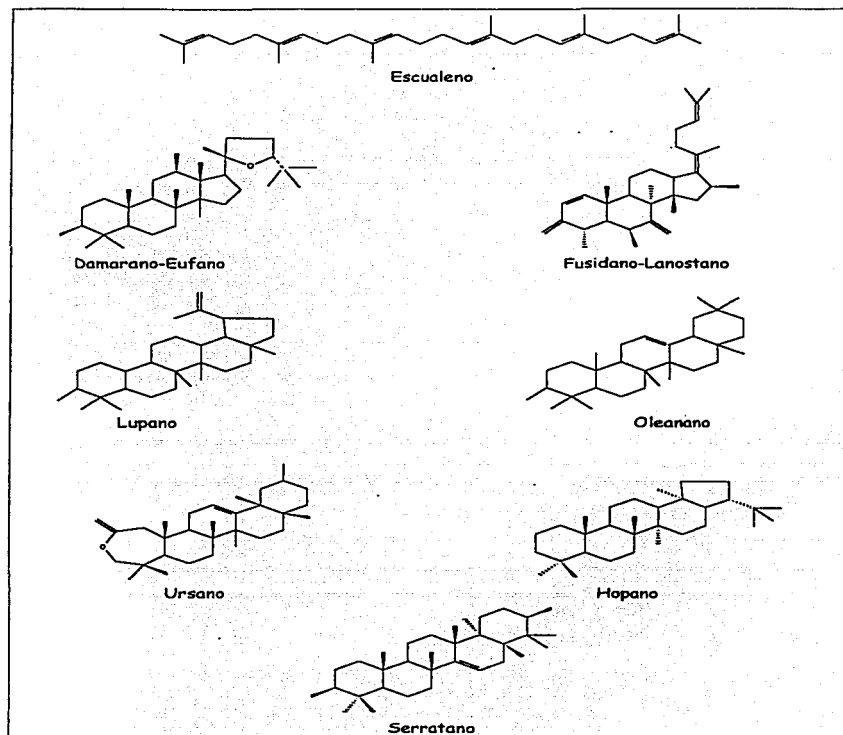


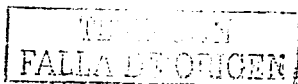
Figura 4. Esqueletos básicos de los diferentes subgrupos de triterpenos [Rosas, 2000].

Capítulo 3. Antimutagénesis

Las técnicas de MN e ICH son frecuentemente utilizadas en la evaluación de la capacidad antimutagénica o antigenotóxica de compuestos o sustancias, por su sencillez y economía en comparación a otros procedimientos como el ensayo cometa y las técnicas de hibridación, entre otras, que son complicadas y costosas. Generalmente, se utilizan como testigos positivos en la experimentación químicos con probada actividad mutagénica, como los agentes quimioterapéuticos entre ellos la ifosfamida, la ciclofosfamida, vinblastina y mitomicina C, por mencionar algunas. Estas técnicas también nos permiten evaluar de manera indirecta la anticarcinogénesis, ya que se sabe que el 90% de las mutaciones generan cáncer [Marquéz, 1997], y que los MN están íntimamente relacionados con la carcinogénesis, pues un MN está formado por fragmentos o cromosomas rezagados relacionados con la regulación de los oncogenes [Wall y Wani, 1993].

Los antimutágenos tienen diversos mecanismos mediante los cuales ejercen su efecto protector al ADN, los cuales implican en general dos grandes grupos:

- 1) Mecanismos extracelulares, como por ejemplo:
 - Evitar que el mutágeno penetre al organismo, las barreras físicas como la piel o las mucosas.
 - Remover al mutágeno del organismo, mediante la dieta rica en fibras.
 - Evitar que se formen los mutágenos de los promutágenos como lo hacen las vitaminas y fenoles entre otros.



2) Mecanismos intracelulares, los cuales:

- Actúan acelerando del metabolismo de los mutágenos.
- Atrapando radicales libres, como lo hacen los antioxidantes.
- Por inhibición de los oncogenes, eliminando células dañadas (apoptosis) como lo hacen los flavonoides o los retinoides.

Los agentes antimutágenos/anticancerígenos pueden estar involucrados en la prevención, como las vacunas, o en el tratamiento como la quimioterapia.

Un solo antimutágeno puede poseer vario mecanismos de acción, que pueden estar traslapados con los de otros agentes; pueden tener diversos mecanismos y actuar a diferentes niveles de carcinogénesis o mutagénesis, o siguen una ruta específica para lograr el fin deseado [De Flora, 1998].

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Capítulo 4. La Ifosfamida

En la figura 5 se muestra la estructura química de la ifosfamida (3-(2cloroetil)-2-(2-cloroetil)-amino)tetrahidro-2H-1,3,2, oxazafosforina -2-óxido) [The Merk index, 1996].

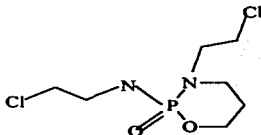


Figura 5. Estructura de la ifosfamida [Kerri y col., 1991]

La ifosfamida es un antineoplásico, empleado en el cáncer de pulmón, carcinoma cérvico uterino y linfomas malignos, que como reacciones secundarias, tiene un efecto neurotóxico, nefrotóxico y urotóxico.

Aunque el mecanismo de acción de la ifosfamida no se ha reportado en la literatura, se conoce el mecanismo de acción de los agentes alquilantes (clasificación farmacológica a la que pertenece la ifosfamida), los agentes alquilantes son sustancias muy reactivas, ya que forman enlaces covalentes con los aminoácidos alterando las proteínas y con las bases púricas y pirimidicas bloqueando la función biológica del ADN [Álvarez, 2000; Secretaria de Salud, 2002].

Los agentes alquilantes actúan por sustitución de un grupo alquilo por iones hidrógeno, y son altamente reactivos con muchos compuestos orgánicos. Su blanco principal son los ácidos nucleicos y su mejor sitio de alquilación es la posición 7N de la guanina, la alquilación interfiere con la síntesis normal de ADN y su función, causando depurinización. Esto resulta en la escisión y/o entrecruzamiento en la

cadena de ADN. Mientras los efectos citotóxico de los agentes alquilantes son atribuidos principalmente al entrecruzamiento irreparable. La depurinización y la escisión de la cadena inducen alteraciones permanentes en la estructura del ADN que pueden resultar en mutagénesis o carcinogénesis [Kerry y col., 1991]. (FIGURA 6)

La ifosfamida pertenece al grupo de fragmentadores cromosómicos S dependientes [Roseinstenster, 2000], *in vitro* la ifosfamida es una prodroga que requiere activación por el citocromo P450 del hígado, además de las enzimas oxidasas para ejercer su actividad citotóxica, la activación de la ifosfamida comienza con la hidroxilación por las enzimas microsomales en el carbono 4 del anillo oxazafosforínico. La 4-hidroxi-ifosfamida se encuentra en equilibrio con su forma tautomérica, la aldo-ifosfamida que es hidrogenada al metabolito inactivo carboxi-ifosfamida o se descompone espontáneamente a la forma de mostaza ifosforamida y acroleína que es el responsable de la urotoxicidad. Los metabolitos inactivos son reducidos a 4-ceto-ifosfamida por sulfatación al compuesto intermediario 4-tio-ifosfamida. Los metabolitos son eliminados vía los riñones [Thomas y col., 1993; Kerry y col., 1991; Thomas y col., 1997].

Su efecto citotóxico (alquilación de los centros nucleofílicos de la célula), reside en el anillo oxazafosforínico activado (hidroxilación a nivel de C4).

La ifosfamida interacciona primariamente con el ADN. Los fosfotriésteres son los principales productos de reacción después de la incubación del ADN con la ifosfamida activada *in vitro*. El procesamiento de los núcleos celulares intactos con ifosfamida también origina la formación de enlaces cruzados en el ADN [Rosenstenster, 2000].

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Capítulo 5. Técnica de Micronúcleos

Los micronúcleos son fragmentos intracitoplasmáticos de cromatina que se encuentran separados del núcleo principal, cuya formación resulta de la pérdida cromosómica durante la división celular o del rompimiento cromosómico formando fragmentos acéntricos que no son incluidos dentro del núcleo principal. La mayoría de los micronúcleos son circulares, pero algunos son ovales o en forma de anillo, las formas dudosas no deben ser tomadas en cuenta. Generalmente, son mucho más pequeños ($1/5$ a $1/20$) que el núcleo principal [Hernández, 1996; Ecobichon, 1997].

Esta prueba se realiza en células de tejido proliferativo, como por ejemplo, células de la cavidad bucal, en hepatocitos fetales, células de la médula ósea, de sangre periférica, etc. Es frecuentemente realizada en células de médula ósea, en donde el agente genotóxico produce daño a los eritroblastos inmaduros y esto se ve reflejado con la presencia de micronúcleos; durante la maduración de los eritroblastos se lleva a cabo el proceso de enucleación perdiendo así el núcleo principal pero no a los micronúcleos. Después de madurar en la médula ósea, los ahora eritrocitos policromáticos son liberados a la circulación sanguínea por lo cual es posible que podamos realizar la prueba en sangre periférica, en donde los MN son fácilmente detectados después de teñir con Giemsa [Hernández, 1996; Mc Gregor y Wehr, 1990; Schmid, 1975]. (FIGURA 7)

Se ha sugerido en varios congresos internacionales el uso solo de ratones machos, ya que generalmente son más sensibles que las hembras para inducción de MN. Puesto que existen diferencias en toxicidad o metabolismo de los fármacos entre machos y hembras es preferible el uso de un solo sexo en el ensayo, siendo adecuado el empleo de los machos. Debido a que no existen diferencias cualitativas en la respuesta a los clastógenos entre cepas, aunque hay diferentes cepas de ratas y ratones que tienen diferentes frecuencias espontáneas de EPC micronucleados, no

hay una cepa preferida. Es apropiado, sin embargo, que la incidencia espontánea no exceda de 0.4 %.

Los animales jóvenes de 6 – 8 semanas para ratones y 8 – 10 semanas para ratas pueden ser utilizados para los estudios porque los animales mayores son más gordos interfiriendo probablemente esto con la claridad de la tinción.

Algunos organismos internacionales que se encargan de recopilar información así como de regular las pruebas de MN han recomendado que se analicen 1000 EPC por cada animal, sin embargo, el número mínimo de EPC para analizar por cada animal depende de la frecuencia espontánea de micronúcleos. Para controles positivos, el tamaño del grupo puede ser pequeño (no menos de 3 animales) usando un tiempo de muestreo óptimo con una dosis para monitorear la sensibilidad. Los elementos a contabilizar son las células micronucleadas y no el número de micronúcleos [“General & Applied , 1999].

Para determinar la citotoxicidad, se examina el índice de EPC / ENC ya que las alteraciones de éste, indican que existió o una inhibición de la división o una maduración excesiva de células eritropoyéticas nucleadas de la médula. Se analizan un total de 1000 eritrocitos [Ledebur y Schmid, 1973; Calderón y Ramirez, 1992].

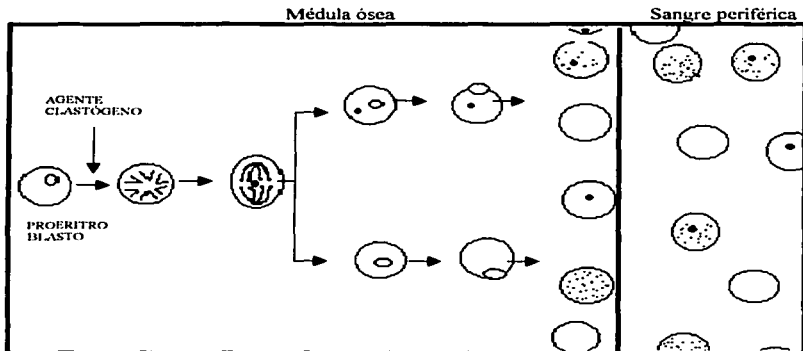


Figura 7. Mecanismo de formación de los micronúcleos en médula ósea de ratón por acción de un agente clastógeno. [Hayashi y col., 1991]

IV. OBJETIVOS

Objetivo General

Estudiar la capacidad anticlastogénica de un extracto hexánico de cuachalalate en sangre periférica de ratones CD1 por la técnica de micronúcleos.

Objetivos Particulares

- Evaluar la frecuencia de micronúcleos inducidos por la ifosfamida, administrando una dosis de 50 mg / kg a ratones cepa CD1, para establecer un control positivo, así como determinar la citotoxicidad del agente evaluando el índice de EPC / ENC.
- Determinar la frecuencia de micronúcleos en ratones CD1 tratados con el extracto de cuachalalate a la dosis de 1000 mg / Kg y determinar así mismo, la citotoxicidad por medio del índice de EPC / ENC.
- Analizar las variaciones en la frecuencia de micronúcleos y la citotoxicidad cuando se administra la ifosfamida junto con diferentes dosis de extracto de cuachalalate.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

V. MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIAL BIOLÓGICO

Se utilizaron 46 ratones machos de la cepa CD1 con un peso promedio de 25 g, obtenidos del bioterio de la FESC C-1, mantenidos bajo las mismas condiciones ambientales y con libre acceso al agua y alimento durante el desarrollo experimental.

Se emplearon 130 gramos de corteza de cuachalate en trozos pequeños, obtenida del Mercado de Sonora de la Ciudad de México.

MATERIAL DE LABORATORIO

Portaobjetos

Tijeras quirúrgicas

Jeringas de 1 ml

Sonda para ratón

Vasos Coplin

EQUIPO

Liofilizador

Microscopio óptico

Rotavapor

Bomba de vacío

Equipo para extracción a reflujo

Balanza analítica

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Equipo para cromatografía de capa fina

REACTIVOS

Ifosfamida

Aceite de maíz

Metanol absoluto

Hexano

Colorante Giemsa (4%)

Buffer de fosfatos pH = 6.8

Ácido masticadienónico

Ácido 3 α -hidroximasticadienónico

MÉTODOS

EXTRACCIÓN DEL CUCHALALATE

1. - Para la extracción del cuachalalate, se pesaron 130 gramos de corteza que se colocaron en un matraz bola y se llevaron a reflujo con 2 porciones de 500 ml de hexano durante una hora.

2. - Por decantación se reunieron las porciones de hexano y se colocaron en un matraz bola, posteriormente se eliminó el disolvente en un rotavapor. El producto se colocó en frascos viales. El disolvente residual se eliminó a vacío por un lapso de cuatro horas y se determinó el rendimiento. El producto se sometió a liofilización pero no se obtuvieron resultados favorables por lo que el extracto se utilizó tal como se obtuvo.

IDENTIFICACION DEL PRODUCTO

1. - Se procedió a la identificación del extracto realizando una cromatografía en capa fina, utilizando como fase inmóvil una placa de sílica gel y como fase móvil una solución 1:1 de hexano y acetato de etilo.

2. - Se compararon los corrimientos con los del ácido masticadienónico y 3 α -hidroximasticadienónico en su forma pura.

DETERMINACIÓN DE LA DOSIS LETAL 50

1. -Se determinó la DL₅₀ de acuerdo al método de Lorke (1983); para lo cual se utilizaron ratones cepa CD1 los que se dividieron en 3 lotes de tres ratones cada uno y se les administró el extracto disuelto en aceite de maíz por vía oral en las dosis siguientes:

1°. Lote.- dosis de 10 mg/kg

2°. Lote.- dosis de 100 mg/kg

3°. Lote.- dosis de 1000 mg/kg

2. -Se observaron los animales durante 24 horas, en busca de signos de intoxicación o muerte. En la siguiente fase del método, dado que no murió ningún ratón, se procedió a administrar a 3 ratones con las dosis de 1600, 2900 y 5000 mg/kg del extracto respectivamente. La observación se prolongó por 24 horas más.

PRUEBA DE MICRONUCLEOS

1. - Para realizar la Prueba de micronúcleos, los ratones se dividieron en seis lotes de cinco ratones cada uno y se les administraron los tratamientos como sigue:

LOTE 1: aceite de maíz

LOTE 2: ifosfamida, en dosis de 50 mg / kg.

LOTE 3: ifosfamida dosis 50 mg / kg + extracto de cuachalalate dosis mg / kg	500
LOTE 4: ifosfamida dosis 50 mg / kg + extracto de cuachalalate dosis mg / kg	1000
LOTE 5: ifosfamida dosis 50 mg / kg + extracto de cuachalalate dosis mg / kg	1500

La ifosfamida se administró por vía intraperitoneal y media hora después se administró por vía oral el extracto disuelto en aceite de maíz.

2. — Antes de la administración de cualquier tratamiento a cada organismo se le realizó un frotis sanguíneo, cortando la porción terminal de la cola, y después del tratamiento, a cada animal se le realizó un frotis por el mismo procedimiento a las 24, 48 y 72 horas post - administración.

3. - Los frotis se suñergieron en metanol absoluto por cinco minutos para fijarlos y posteriormente se tiñeron con colorante Giemsa al 4 % en buffer de fosfatos pH = 6.8.

4. — En cada uno de los animales se determinó la frecuencia de eritrocitos policromáticos micronucleados en 1000 eritrocitos policromáticos. Además se cuantificó el número de eritrocitos policromáticos en un total de 1000 eritrocitos.

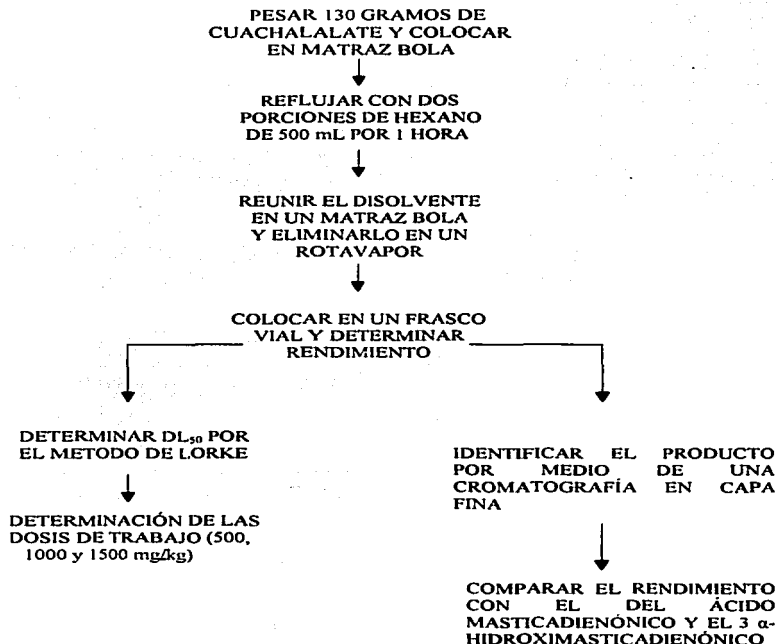
5. - El análisis estadístico de los resultados se realizó por ANOVA y comparaciones múltiples de Tuckey con un $\alpha = 0.05$

6.- Para obtener el % de inhibición se tomó el número de micronúcleos inducidos por ifosfamida como el 100 % y posteriormente se obtuvo el % de micronúcleos correspondiente a cada dosis y en cada hora con la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{\# de MN de IFF}}{\text{\# de MN de cada lote}} \times 100 = \% \text{ de MN de cada lote}$$

al 100 se le resta el porcentaje obtenido, y el resultado es el % de inhibición.

DIAGRAMA DE FLUJO

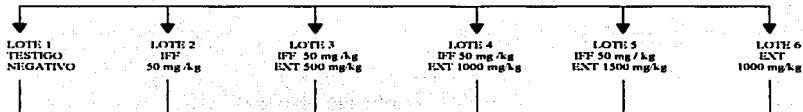


ENSAYO DE MICRONÚCLEOS

TOMAR FROTIS SANGUÍNEO



ADMINISTRAR



TOMAR FROTIS A LAS 24
48 Y 72 HORAS DESPUES DEL
TRATAMIENTO



FIJAR LOS FROTIS EN METANOL
Y TEÑIR CON GIEMSA



EXAMEN MICROSCOPICO:
a) CONTAR 1000 ERITROCITOS
TOTALES, CLASIFICANDOLOS
COMO EPC Y ENC.

b) PRESENCIA DE MN
EN 1000 EPC.



ANALISIS ESTADISTICO DE LOS
RESULTADOS

VI. RESULTADOS

En los resultados referentes a la eficiencia de la extracción realizada a la corteza del árbol de cuachalalate, se tuvo un rendimiento del 4.81%, ya que de los 130g de corteza que se pusieron a reflujo se obtuvieron 6.26g del extracto, el cual tenía consistencia pegajosa y de color verde olivo.

En la figura 8 se muestra la cromatografía de capa fina, que se realizó al extracto para comprobar la presencia de los ácidos masticadienónico y 3 α -hidroximasticadienónico, se encontró que dichos ácidos si están presentes en el extracto.



Figura 8. Corrimiento cromatográfico del extracto hexánico del cuachalalate. 1 Extracto hexánico de cuachalalate, 2 ácido masticadienónico y 3 ácido 3 α -hidroximasticadienónico.

Antes y durante el tiempo de experimentación no se percibieron cambios físicos, ni conductuales en los ratones. Además después del sacrificio de los animales se realizó una observación macroscópica de sus órganos internos y al compararlos con los de ratones no tratados, tampoco existieron alteraciones aparentes, aunque para determinar esto con seguridad hubiese sido conveniente realizar un estudio histológico convencional.

No se determinó con exactitud el valor de la dosis letal 50 del extracto hexánico del cuachalalate, debido a que la técnica empleada para este fin sugiere probar una dosis máxima de 5000 mg/kg, dosis a la cual el extracto mostró ser inocuo, ya que por arriba de ésta no son de interés práctico.

En la figura 9 se muestra la frecuencia de EPC MN en función del tiempo para el lote 1 o testigo negativo; donde se puede observar que la frecuencia de EPC MN fue baja en todos los tiempos analizados y no hubo variación estadísticamente significativa ($p > 0.05$), según la prueba de ANOVA. En promedio, el número de MN obtenido fue menor a 1, dicho valor representa la basal para este experimento. El valor basal sirve como referencia, ya que al comparar el número de MN presentes en los lotes a los cuales se les administró alguna sustancia contra el valor basal, se puede observar si ésta induce o no la formación de micronúcleos.

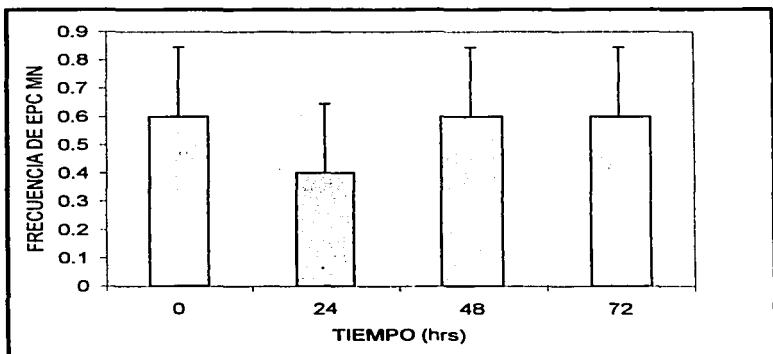


Figura 9. Frecuencia de EPC MN en 1000 EPC y error estándar en el lote testigo negativo.

Como se observa en la figura 10 la frecuencia de EPC presentes en 1000 eritrocitos en función del tiempo para el testigo negativo, no mostró variación estadísticamente significativa ($p > 0.05$) durante las 72 horas. A través de la relación EPC/ENC se evalúa la citotoxicidad de las sustancias administradas.

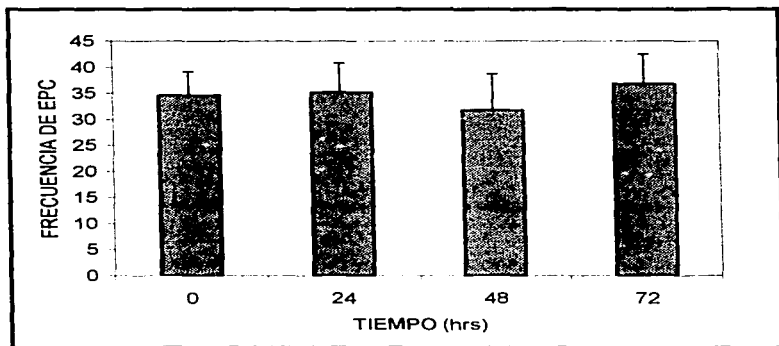


Figura 10. Frecuencia de EPC en 1000 eritrocitos y error estándar en el lote testigo negativo.

En la figura 11 se muestra en función del tiempo; la frecuencia de MN del lote 2, que fue el testigo positivo, en dicho lote se observó que la frecuencia de MN fue alta comparada con el control negativo, a excepción de la hora 0 en donde la frecuencia de ambos lotes fue similar. La variación dentro del lote de ifosfámda a las diferentes horas fue significativa ($p < 0.05$), como puede observarse el tiempo de máxima inducción de MN fue a las 48 horas, con un promedio de 8.6.

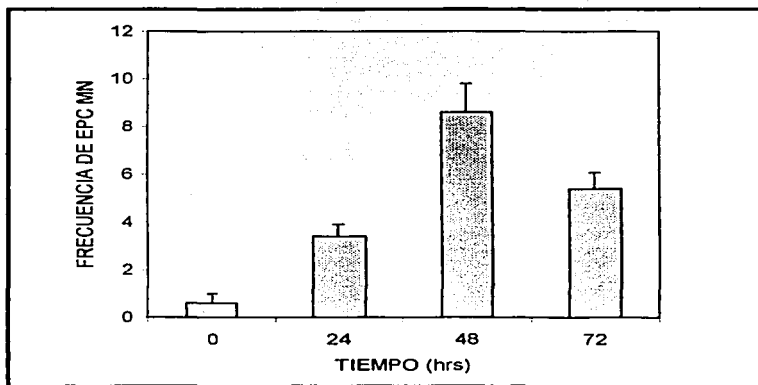


Figura 11. Frecuencia de EPC MN en 1000 EPC y error estándar para el lote al que se administró ifosfámda a la dosis de 50 mg/kg.

En la figura 12 se presenta la frecuencia de EPC para el testigo positivo; se observa que conforme transcurrió el tiempo fue disminuyendo la frecuencia de EPC, presentándose variación estadísticamente significativa ($p < 0.05$) entre las 0 y las 72 horas.

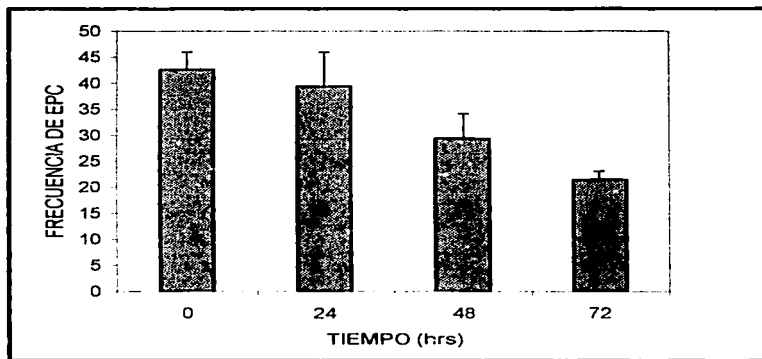


Figura 12. Frecuencia de EPC en 1000 eritrocitos y error estándar para el lote al que se administró ifosfamida a la dosis de 50 mg/kg.

En la figura 13 aparece la frecuencia de EPC MN de los lotes 3, 4 y 5 a los cuales se les administró IFF a la dosis de 50 mg/kg y el extracto a las dosis de 500, 1000 y 1500 mg/kg respectivamente; en ella se observa que los 3 lotes mostraron frecuencias bajas de MN a el tiempo 0, las cuales se incrementaron al tiempo 24 y aumentaron aún más al tiempo 48, aunque al tiempo 72 nuevamente disminuyeron.

Al comparar la frecuencia de MN dentro de cada lote en los diferentes tiempos analizados, no se presentaron diferencias estadísticamente significativas ($p > 0.05$) excepto para el lote 4 donde se presentó una diferencia estadísticamente significativa entre los tiempos 0 y 48 únicamente, a pesar de que dicha frecuencia no permaneció constante a través del tiempo en ninguno de los lotes, esto se aprecia claramente en la figura 13.

Por otro lado, al comparar la frecuencia de MN del lote testigo de IFF con los lotes 3, 4 y 5 se presentaron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) con los lotes 3 y 4 a las 48 y 72 horas, y con el lote 5 a partir de la hora 24; se observa que la frecuencia más elevada de MN fue del lote 4 el cual alcanzó un promedio de 3.2, sin embargo este valor es inferior a la frecuencia de MN producidos por IFF (un promedio de 8.6) al tiempo de máxima inducción.

Al comparar a los tres lotes con el testigo negativo, únicamente se presentó diferencia estadísticamente significativa entre el testigo negativo y el lote 4 a la hora 48, lo que en resumen indicaría que el extracto disminuyó la frecuencia de MN inducidos por la ifosfamida.

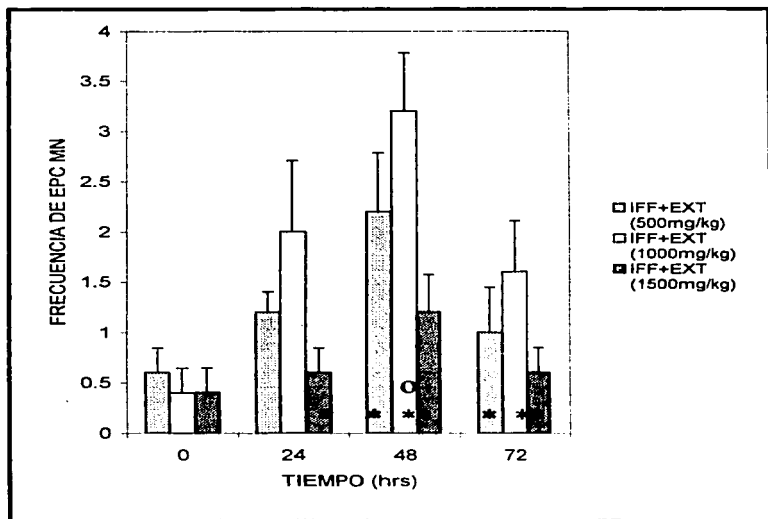


Figura 13. Frecuencia de EPC MN en 1000 EPC y error estándar en el estudio del extracto hexánico del cuachalalate en combinación con ifosfamida.

*Diferencia estadísticamente significativa respecto al testigo positivo. O Diferencia estadísticamente significativa respecto al testigo negativo. Pruebas de ANOVA y Tukey ($\alpha = 0.05$).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

En la figura 14 se muestra el grado de inhibición de la frecuencia de MN inducidos por IFF a partir de las 24 horas, para los lotes de IFF+ EXT a las 3 diferentes dosis. En la dosis de 500 mg/kg del extracto se observó que la inhibición de MN fue incrementándose conforme avanzó el tiempo, o sea que a mayor tiempo mayor inhibición llegando incluso a ser superior al 80 % a las 72 horas; en la dosis de 1000 mg/kg también se observó que hubo inhibición en la frecuencia de MN aunque dicha inhibición fue inexplicablemente menor que en la dosis de 500; en la dosis de 1500 mg/kg se obtuvo una inhibición mayor al 80% en todos los tiempos, siendo esta dosis la más efectiva para la inhibición de MN.

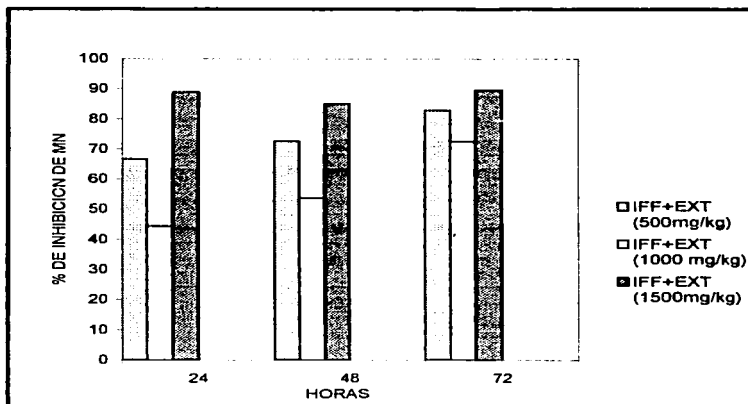


Figura 14. Grado de inhibición de MN producido por el extracto del cuachalalate.

En la figura 15 se muestra graficada la frecuencia de EPC en función del tiempo, de los lotes a los que se les administró IFF y el extracto a las diferentes dosis, los tres lotes mostraron una disminución de EPC conforme transcurrió el tiempo; dentro del lote 3 hay variación estadísticamente significativa ($p < 0.05$) solo entre las horas 0 y 72 lo cual es apreciable en la figura, dentro de los lotes 4 y 5 la variación no fue estadísticamente significativa ($p > 0.05$).

Al comparar los lotes 3 y 4 contra el testigo negativo no se observan diferencias significativas a las 0, 24 y 48 horas, pero si hay variación significativa a las 72 horas donde estos lotes muestran disminución en el número de EPC; el lote 5 no muestra diferencia significativa con respecto al testigo negativo a las 0 y 24 horas, pero si hay variación significativa a las 48 y 72 horas.

Al comparar los lotes contra el testigo positivo, tenemos que los lotes 3 y 4 no muestran variación estadísticamente significativa, pero el lote 5 a las 24 y 48 horas si muestra variación significativa con respecto al control positivo ya que el número de EPC de el lote 5 es menor que el de la ifosfámda, a las 72 horas ya no hay diferencia significativa entre el lote 5 y el testigo positivo aunque en ambos tiende a disminuir la frecuencia de EPC, lo cual nos indica que la combinación del extracto y la ifosfámda ejerce un efecto citotóxico mayor que el de cada una de los componentes por si solo, y en el mayor tiempo de exposición.

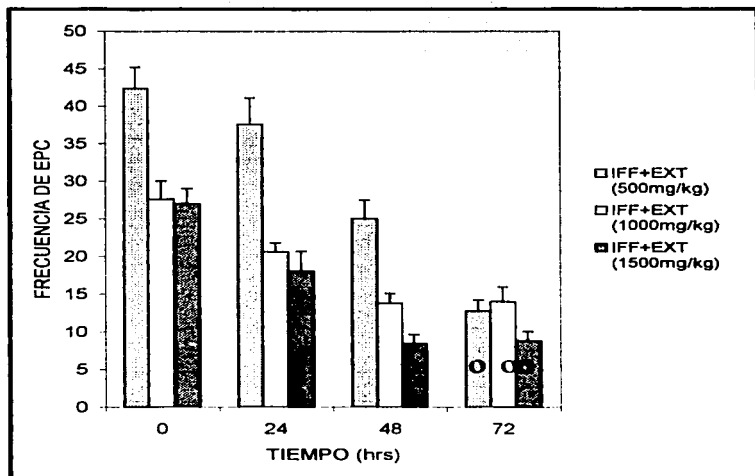


Figura 15. Frecuencia de EPC en 1000 eritrocitos y error estándar en el estudio del extracto del cuachalalate en combinación con ifosfamida.

*Diferencia estadísticamente significativa respecto al testigo positivo. ○ Diferencia estadísticamente significativa respecto al testigo negativo. Pruebas de ANOVA y Tukey ($\alpha = 0.05$).

En la figura 16 se muestra al lote 6 que fue al cual se le administró solamente extracto a la dosis de 1000 mg/kg. Este grupo presentó una frecuencia de MN baja, similar a la del control negativo, dicha frecuencia se mantuvo así durante todo el tiempo de evaluación, por lo que dentro del lote no hubo diferencia estadísticamente significativa ($p > 0.05$).

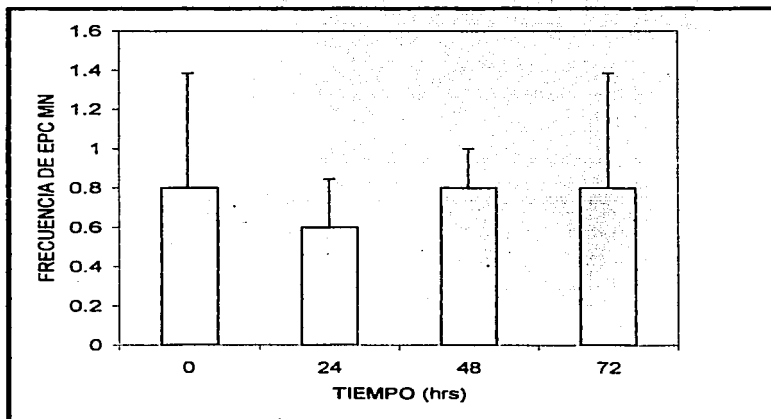


Figura 16. Frecuencia de EPC MN en 1000 EPC y su error estándar en el lote administrado con extracto hexánico de cuachalalate a la dosis de 1000mg/kg.

La frecuencia de EPC del lote 6 (extracto solo, 1000 mg/kg) se muestra en la figura 17, la cual indica que no hubo diferencia estadísticamente significativa ($p > 0.05$) entre los diferentes tiempos evaluados. Dicha frecuencia fue similar a la del lote testigo negativo.

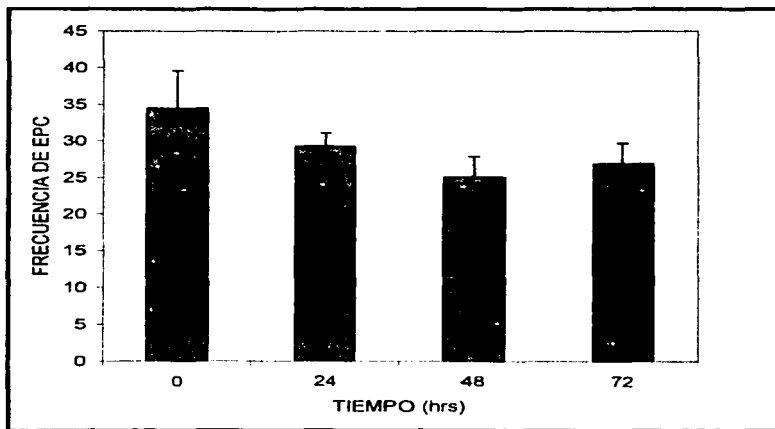


Figura 17. Frecuencia de EPC en 1000 eritrocitos y error estándar en el lote administrado con extracto hexánico de cuachalalate a la dosis de 1000mg/kg.

VII. DISCUSIÓN

Las características físicas del extracto obtenido son muy similares a las características reportadas en la bibliografía por Navarrete, (1982), no así el rendimiento, pues él lo obtuvo del 3.7 % comparado con el 4.8 % que se obtuvo en la presente investigación. Cabe destacar que el rendimiento que se puede obtener de la planta depende del sexo de la misma, así como de la época del año en que se recolecte la corteza y no existen referencias bibliográficas que indiquen cual es la cantidad existente de ácidos másticos presentes en la corteza, sin embargo, por una comunicación verbal con el Dr. Mariano Martínez, químico del Instituto de Química de la UNAM, enfocado al estudio del cuachalalate, indica que su equipo obtiene un rendimiento promedio de 4.5 %, que se asemeja al resultado obtenido.

La cromatografía del extracto permitió por un lado demostrar que se trabajó con la corteza de cuachalalate sin adulterar y no con otras especies anatómicamente similares, ya que estas últimas no contienen a los ácidos másticos, ácidos presentes solo en la familia de las Julianiaceas y en el género pistacia (Gabr, 1991); género que es muy distinto físicamente con el cuachalalate, lo cual no hace posible una equivocación al trabajar con las distintas especies. Por otro lado, la identificación de los ácidos másticos en el extracto hexánico los involucra o incluso compromete en la acción antigenotóxica que estamos evaluando.

Por otro lado, la dosis letal 50 no fue determinada exactamente, ya que a la dosis de 5000 mg/kg el extracto resultó ser prácticamente no tóxico, este resultado se correlacionó con el análisis de las características físicas, tanto externas, como internas, de los animales administrados en los que no se observaron cambios, así como tampoco en su comportamiento. Aún cuando no existen datos bibliográficos del cuachalalate que anulen o corroboren estos resultados, otros extractos de plantas medicinales han mostrado este comportamiento, por ejemplo el extracto acuoso de gordolobo (*Gnaphalium oxyphyllum*) [Luna, 1999], lo cual es excelente, ya que se

hace uso de ellos de manera casera y un margen de seguridad tan amplio evita que existan intoxicaciones.

El extracto hexánico, no resultó ser genotóxico, *per se*, ya que la cantidad de micronúcleos producidos no mostró diferencias estadísticamente significativas con respecto al testigo negativo, ni con respecto al valor basal de la hora cero del mismo lote. Por consecuencia, esto implica que los ácidos másticos presentes en el extracto no provocan daño de tipo clastogénico, al material genético.

La ifosfamida presentó un daño genotóxico desde las 24 horas, sin embargo el efecto máximo fue a las 48, incrementando hasta en 20 veces la frecuencia de EPCMN, obtenida en el testigo negativo. Después de este máximo, el daño disminuye por la cinética de eliminación propia del fármaco, estos resultados son similares con lo reportado por Wolf y col, que en 1997 demostraron el alto potencial genotóxico de la ifosfamida al observar que aumentaba la frecuencia de micronúcleos en sangre periférica de embriones de gallina.

Además Hayashi y col., (1994) han sugerido que después de una administración como la realizada, las muestras sanguíneas alcanzan el estado estacionario en la frecuencia de EPC micronucleados entre las 48 y las 72 horas post - administración, como se observa en los resultados que se obtuvieron.

En los resultados de antigenotoxicidad se observó que el extracto de cuachalalate disminuyó el número de micronúcleos producidos por IFF a todas las dosis y en todos los horarios, puesto que no se observa una diferencia estadísticamente significativa con el testigo negativo y si presenta una diferencia estadísticamente significativa (< 0.05), con el testigo positivo, lográndose hasta el 90 % de inhibición.

La dosis de 500 mg/kg tuvo un por ciento de inhibición del 67 - 82% tendiendo a un aumento con en el tiempo. Con la dosis de 1000 mg/kg se presentó el menor

grado de inhibición, comparada con las otras dos dosis (42 - 70 %) que sin embargo, aumenta con el tiempo, por lo que resulta ser también efectiva, mostrándose mayor capacidad inhibitoria en la dosis de 1500 mg/kg con un porcentaje promedio del 90 %.

Con respecto a la citotoxicidad, la ifosfamida mostró la tendencia citotóxica que se esperaba pues al intercalarse entre las fibras de ADN durante la síntesis de éste, se detiene la división celular, esto propicia la ruptura de la cadena y el ADN ya no se sintetiza por consiguiente la célula ya no se divide más, y si no es reparada, morirá.

Por otro lado el extracto a la dosis de 1000 mg/kg no mostró diferencias estadísticamente significativas con el lote testigo negativo, en relación a la frecuencia de EPC, por lo cual se concluye que no es citotóxico *per se*. Sin embargo, cuando se administra el extracto junto con la ifosfamida, se observa una tendencia citotóxica que resulta significativa, al aumentar la dosis del extracto y conforme aumenta el tiempo, esto pareciera indicar un efecto sinérgico con la ifosfamida, no obstante, este efecto se esperaría también en el aumento en el número de micronúcleos producidos, cosa que no ocurre, así pues el extracto estaría dando dos resultados distintos, por un lado, el efecto sinérgico con la ifosfamida en lo referente a la citotoxicidad y por el otro lado un efecto genoprotector contra la misma ifosfamida en la inducción de micronúcleos.

Una de las posibles explicaciones, es que el extracto induzca a una reparación, y por lo tanto, la célula ocupa tiempo en repararse y el proceso de división celular se ve retrasado, y por eso se observan pocas células micronucleadas, y disminuyen los EPC.

Otra posible explicación es que el extracto actúe sobre la biotransformación de la ifosfamida, haciendo más rápida su farmacocinética, así los metabolitos que son la forma activa del fármaco (Rosenstein, 2000) actuarían de forma más rápida

produciendo un efecto citotóxico más rápido y pasajero. Esto explicaría por qué el número de micronúcleos está disminuido ya que al pasar rápidamente no alcanza a dañar a la célula, pero no explicaría la disminución de EPC.

Otra explicación, es que exista un mecanismo por el cual, el cuachalalate induzca a las células dañadas a una muerte programada o apoptosis. La apoptosis como mecanismo fisiológico de muerte celular explica el "suicidio" de una gran cantidad de células del cuerpo. Muchas de ellas mueren porque han cumplido un número predeterminado de divisiones, porque han sido dañadas o porque están envejecidas. La apoptosis inducida por los linfocitos T citotóxicos es un fenómeno que se caracteriza por un aumento en la expresión de ciertos genes (como por ejemplo, los que codifican para la síntesis de algunas lisp, la ubiquitina, *c-fos*, *c-myc* y varios más) [Schwartz y Osborne, 1993]. La apoptosis puede ser estimulada por muchos factores, algunos de los más conocidos son: las radiaciones ionizantes, las radiaciones UV que dañan el ADN, los fármacos que se utilizan como quimioterapia, los radicales libres que resultan del metabolismo del oxígeno, algunos oxidantes como el óxido nítrico producido por los macrófagos o los monocitos, entre otras. Todos estos factores, que son inductores de la apoptosis, pueden tener distintos mecanismos de acción para provocar un daño en el ADN de la célula que va a morir y estimular la transcripción de los genes que están relacionados con la muerte celular programada [García, 1997]. Aquí es donde el cuachalalate pudiera estar aumentando alguno de los mecanismos por los cuales la apoptosis se ve favorecida o bien que haga que las células encargadas de eliminarlas sean más eficientes, así algunas de las células mueren por apoptosis, otras prefieren el camino de la autoreparación, mientras que otras se quedan dañadas y son las células que se observan en la gráfica de EPCMN. González y col., en 1962 observaron que un extracto metanólico de cuachalalate eliminaba el adenocarcinoma mamario inducido en ratones, lo que daría un indicio de que es posible que el camino por el cual actúa el cuachalalate sea el de mandar a células dañadas a apoptosis.

Ya sea que el cuachalalate induzca la muerte de células dañadas, o bien que induzca una reparación del daño al ADN, el cuachalalate, se perfila como un buen tratamiento o preventivo contra el cáncer, sin embargo, no se sabe si solo induce la muerte de las células dañadas o también lo hace con células sanas, como la mayoría de los fármacos que se utilizan en la quimioterapia. La gráfica referente a la citotoxicidad del extracto solo, en la que se observa que el extracto no es citotóxico, hace referencia a que las células que se encuentran en buen estado no están siendo afectadas, por lo que se puede decir, que el extracto actúa aparentemente solo sobre células dañadas. Por la importancia de esta característica observada, se ve necesario que a futuro se deberán realizar nuevas investigaciones que traten de comprobar el efecto citotóxico selectivo del cuachalalate. Además, será también muy importante identificar si son los ácidos másticos por si solos, o combinados con otros de los compuestos presentes en el cuachalalate, los principios activos que poseen la capacidad antigenotóxica y por consiguiente anticarcinogénica.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

VIII. CONCLUSIONES

El los ratones tratados con el extracto hexánico de cuachalalate no se incrementó la frecuencia de EPCMN, lo cual indica que el extracto *per se* y por consiguiente cada uno de sus componentes, no son clastogénicos.

El extracto hexánico de cuachalalate en las 3 dosis probadas, disminuyó la frecuencia de EPCMN producidos por la ifosfamida. Esta inhibición clastogénica alcanzó su máximo efecto, (90%) de inhibición en el grupo de animales que recibieron 1500 mg/kg del extracto a las 72 horas de administración.

La frecuencia de EPC disminuyó a través del tiempo de administración, en todos los lotes que recibieron ifosfamida y el extracto, poniéndose de manifiesto una acción citotóxica sinérgica, la cual posiblemente este involucrada en el mecanismo anticlastogénico del extracto.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

VII. GLOSARIO *

Acéntrico.- Fragmento o región del cromosoma que no tiene centrómero.

Alcaloide.- Base vegetal nitrogenada que tiene acción fisiológica más o menos intensa sobre los animales.

Antagonista.- Sustancia que disminuye o elimina el efecto de otra.

Anticlastógeno.- Agente químico que impide las rupturas cromosómicas por agentes físicos o químicos.

Antineoplásico.- Fármaco utilizado para tratar el cáncer al inhibir la proliferación celular.

Antitumoral.- Fármaco o elemento capaz de eliminar o prevenir los tumores.

Citotoxicidad.- Efecto tóxico, manifestado como muerte celular.

Clastógeno.- Agente físico o químico que produce rupturas cromosómicas.

Cucurbitacina.- Triterpenos tetracíclicos procedentes de una reagrupación del prostanol, presente en la familia de las cucurbitáceas.

ENC.-Eritrocitos normocrómicos: eritrocitos maduros del ratón.

EPC.- Eritrocitos policromáticos: eritrocitos inmaduros que contienen una cantidad determinada de ARN, son equivalentes a los reticulocitos humanos.

Flavonoides.- Pigmentos vegetales que poseen un esqueleto carbonado $C_6 - C_3 - C_6$.

Genotoxicidad.- Efecto tóxico que actúa sobre el ADN.

Glicósidos.- Sustancias amargas derivadas de los esteroides y que actúa sobre el corazón (glicósidos cardenólicos).

Lignano.- Compuestos de 18 carbonos derivados de dos restos de fenilpropano.

Potenciación.- Acción que tiene una sustancia de aumentar el efecto de otra.

Rezagó anafásico.- Pérdida de un cromosoma al no migrar éste durante la anafase.

Saponina.- Grupo de glicósidos que se disuelven en agua y disminuyen la tensión superficial de esta.

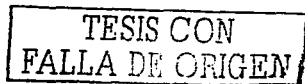
Triterpenoide.- Esta compuesto de 30 Carbonos, formado por 6 unidades de isopreno.

Triterpenos.- Compuestos de 30 Carbonos procedentes de la ciclación del escualeno.

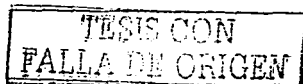
¹ • Dominguez, 1973; Mc Van, 1995; Rieger, 1991; General & applied, 1999.

X. BIBLIOGRAFÍA

1. Álvarez, G. I. 2000. Efecto inhibitorio de la naringina contra la genotoxicidad producida por la ifosfamida y el metilmetanosulfonato in vivo. Tesis de maestría. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas IPN. México.
2. Álvarez, J. R. 1998. Enciclopedia de México. USA. pp 1899.
3. Barton, H. R. Seoane, E. 1956. Triterpenoids. The constitution and stereochemistry of masticadienonic acid. *Journal of Chemistry Society*. 801: 4150 - 60
4. Betancourt, Y. 2001. 1000 plantas medicinales y aromáticas de México. Jardín botánico de Tlaxcala. <http://www.sdnip.undp.org/ce/forums/mgr/sdnca/msg/0264/.htm>
5. Bye, R., Linares, E. 1999. Plantas medicinales del México prehispánico en: "Arqueología Mexicana. Plantas Medicinales Prehispánicas". Vol. VII. No 39. 4-13.
6. Calabresi, P., Park, R. 1986. Agentes de alquilación, antimetabolitos, hormonas y otros agentes proliferantes en: Bases farmacológicas de la terapéutica. Goodman, L., Gilman, A. editores. 5ª ed. Editorial Interamericana.
7. Calderón, M. E., Ramírez, H. L. 1992. Efecto mutagénico inducido por capsaicina sobre eritrocitos policromáticos de sangre periférica detectado mediante la prueba de micronúcleos en un estudio subagudo in vivo. Tesis profesional FESC -UNAM.
8. Cruz, A. 2001. Certifican valor curativo de plantas. <http://www.reforma.com/ciencia/articulo/092980/>
9. De Flora, S. 1998. Mechanisms of inhibitors of mutagenesis and carcinogenesis. *Mutation Research* 402: 151-158.
10. Díaz-Barriga, S., Madrigal-Bujaidar, E., Márquez, P. 1999. Inhibitory effect of nordihydroguaiaretic acid on the frequency of micronuclei induced by methyl methanesulfonate in vivo. *Mutation Research* 441: 53-58.
11. Domínguez, X. A. 1973. Métodos de investigación fitoquímica. Ed. Limusa. México.



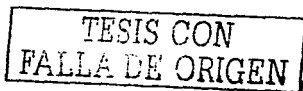
12. Domínguez, X. A., Franco, R., García, S. 1983. Plantas medicinales mexicanas XLVIII. Estructura del ácido instiopolínico separado de la corteza del cuachalalate (*Amphipterygium adstringens*) Schl. Revista Latinoamericana de Química 14: 99, 100.
13. Ecobichon, D., J. ed. 1997. The basis of toxicity testing. 2ª ed. CRP Press. pp 172 – 174.
14. Gabr, K. E. 1991. Influence of indomethacin – mastic combinations on dissolution, absorption and gastrointestinal mucosal damage in rats. International Journal of Pharmaceutics 158: 137 – 145.
15. García, T. F. 1997. Fundamentos de inmunología. UNAM. pp 334.
16. General & applied toxicology. 1999. 2ª ed. Vol. 2. Grove's dictionaries INC. USA & Canadá. pp 1085 – 1088.
17. González, E., McKenna, G., Delgado, J. 1962. Anticancer evaluation of *Amphipterygium adstringens*. Journal of Pharmaceutical Sciences 51 (9): 901 – 903.
18. Hayashi, M., Sofuni, T., Morita, T. 1991. Simulation study of the effects of multiple treatments in the mouse bone marrow micronucleus test. Mutation Research 252. 281-287.
19. Hayashi, R., Mac Gregor, J. T., Tice, R. R. 1994. In vivo rodent erythrocyte micronucleus assay. Mutation Research 312: 293 – 304.
20. Hernández, C., A. 1996 Efecto anticlastogénico de la clorofilina en contra del nitrato de sodio evaluado en ratones cepa NIH. Tesis profesional. FESC-UNAM. pp 20 – 23, 31 - 33
21. Kery; L., Dechant, N., Pilkington; T., Faulds, P. 1991. Ifosfamide/Mesna. A review of its antineoplastic activity, pharmacokinetic properties and therapeutic efficacy in cancer. Drugs 42(3): 428-467.
22. Ledebur, M., Schmid, W. 1973. The Micronucleus Test. Methodological aspects. Mutation Research 19: 109-117.
23. Lorke, P. 1983. A new approach to practical acute toxicity testing. Archives of Toxicology 54: 275 – 287.



24. Lozoya, X. 1999. Códice Badiano en: "Arqueología Mexicana. Plantas Medicinales Prehispánicas". Vol. VII: No 39. 22-23.
25. Luna, M. 1999. Estudio de la capacidad antigenotóxica del gordolobo (*Gnaphalium oxyphyllum*) evaluada por la frecuencia de ICH *in vivo*. Tesis profesional. FESC- UNAM.
26. Macgregor, J. M., Wehr, C. 1990 The *in vivo* erythrocyte micronucleus test: measurement at steady state increase assay efficiency and permits integration with toxicity studies. *Fundamental and toxicology* 14: 513-522.
27. Madrigal-Bujaidar, E., Díaz-Barriga, S., Cassani, M., Márquez, P., 1998. *In vivo* and *in vitro* antigenotoxic effect of nordihydroguaiaretic acid on the frequency of SCEs induced by methyl methanesulfonate. *Mutation research* 419: 163-168.
28. Marquéz, B. 1997. Estudio de la capacidad antigenotóxica del ácido nordihidroguaiaretico evaluada *in vivo* con las pruebas de micronúcleos y Frecuencia de ICH. Tesis profesional. FESC- UNAM.
29. Martínez, M. 1991. Catálogo de nombres vulgares y científicos de plantas mexicanas. Fondo de Cultura Económica. México.
30. Martínez, V. M., Olivera, O., Solares, A., Soto, H. 1999. Phytochemical study of cuachalalate (*amphypterygium adstringens* schiede ex Schlecht). *Journal of Ethnopharmacology* 68: 109 – 113.
31. Mata, R., Calzada, F., Navarrete, A., del Río, F., Delgado, G. 1991. Long - chain phenols from the bark of *Amphypterygium adstringens*. *Journal of Ethnopharmacology* 43: 147 – 154
32. Mc Van, B. 1995. Referencias farmacéuticas. El Manual Moderno. México . pp 930
33. Montero, R. A., Pérez, A. G., Fernández, E. N., Bada, B. A. 2001. Estudio genotóxico *in vivo* de 6 extractos de plantas medicinales en células de la médula ósea de roedores. *Revista de Toxicología* 18: 75 – 78.
34. Navarrete, A., Mata, R., Delgado, G. 1982. Alkylarcardic acids from *Amphypterygium adstringens*. *Planta Médica* 55: 579.



35. Navarrete, C. A. 1982. Estudio químico y pruebas farmacológicas a la corteza de *Juliana adstringens*. Tesis profesional. FESZ- UNAM.
36. Navarrete, C. A., Reyes, B., Silva, A. 1990. Evaluación farmacológica de la actividad antiulcerosa de *Amphipterygium adstringens* (Cuachalalate). Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas 21: 28-32.
37. Página web. 2001. Fitoterapia. <http://www.personal.redestb.es/martin/fito.htm>
38. Página web 2002. *Amphipterygium adstringens*. http://www.scmamap.gob.mx/pfam2/fichas/amphipterygium_adstringens.htm
39. Página web. 2002. Constituyentes bioactivos adicionales de *Amphipterygium adstringens*. <http://depa.quim.unam.mx/subprograma127/sib127%20m05.htm>
40. Página web. 2002. Taxol. <http://taxol.com/timeli.htm/>
41. Papageorgiou, V. P., Bakola - Christianopoulou, M. N., Apazidou, K. K., Psarrod, E. E. 1997. Gas chromatographic - mass spectroscopic analysis of the acidic triterpenic fraction of mastic gum. Journal of Chromatography 769: 263 - 273.
42. Rieger, M. G. 1991. Glossary of genetics classical and molecular. 5ª ed. Springer Verlag. Alemania. pp 339-345
43. Rosas, A. H. 2000. Análisis fitoquímico de *Cytocarpa procera* HBK y *Amphipterygium adstringens* Shiede ex Schecht. Tesis de Maestría. Colegio de Postgraduados. Instituto de Recursos Naturales. Estado de México. pp 3 - 19.
44. Rosensteinstner, editor. 2000. Diccionario de especialidades Farmacéuticas. PLM ediciones. México.
45. Schwartz, L. M., Osborne, B. A. 1993. Programmed cell death, apoptosis and killer genes. Immunology Today 14: 582.
46. Schmid, W. 1975. The Micronucleus Test. Mutation Research 31: 9-15.
47. Secretaria de Salud. 2002. http://www.salud.gob.mx/salud_laboral/guia_manejo_citostaticos.htm



48. The Merck Index. 1996. 12^a ed. Merck & CO. INC. EUA. pp 841,842.
49. Thomas, K., Chang, L., Maurel, P., Waxman, D. 1997. Enhanced cyclophosphamide and ifosfamide activation in primary human hepatocyte cultures: response to cytochrome P450. Inducers and autoinduction by oxazaphosphorines. *Cancer Research* 57: 1946-1954.
50. Thomas, K., Chgang, G., Weber, CH., Waxman, D. 1993. Differential activation of cyclophosphamide and ifosfamide by cytochromes P450 2B and 3^a in human liver microsomes. *Cancer Research* 53: 5629-5637.
51. Trease, G. E., Evans, W. 1987. Tratado de farmacognosia. 12^a ed. Nueva Editorial Interamericana. México.
52. Wall, M. Wani, M. 1993. Antimutagenic agents from natural products of terrestrial and marine origin. En: Antimutagenesis and anticarcinogenesis mechanisms III. Edited by G Gronaetti. Press. New York. pp 87 - 97.
53. Wolf, P., Luepke, N. P. 1997. Formation of micronuclei in incubated hens at mesure of genotoxicity. *Mutation Research* 394: 163 - 175.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN