



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

Evaluación genotóxica "*in vitro*" del extracto acuoso de la corteza de
Amphipterygium adstringens por medio de los intercambios entre cromátidas
hermanas.

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

PRESENTA

ELVIRA PORTILLA LÓPEZ

Asesora: Dra. Sandra Díaz-Barriga Arceo

Cuautilán Izcalli, Estado de México.

2007



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.

*A la memoria de mi madre
A mi padre,
A mis hermanas y hermano,
A mis sobrinos
A mi esposo,
A mis hijos.*

Agradezco:

A la Universidad Autónoma de México por haberme brindado la oportunidad y el honor de haber accedido a la mejor educación de México y América Latina.

A las profesoras que estuvieron involucradas en este proyecto:

Dra. Sandra Díaz-Barriga Arceo, por la confianza que depositó en mí, ZFB, Rosalía Bonilla Sánchez, gracias por su amistad; MC Virginia Olivia Arellano, ZFI Guadalupe Koizumi Castro y ZFB Jazmín Flores Monroy por su tiempo y sus conocimientos dedicados a la revisión de este trabajo.

A mis amigas y amigo:

Alicia, Jesús Alberto, Elsa, Sara, Jessica y Maritza por, abrirme su corazón.

ÍNDICE

	Pág.
RESUMEN	
CONTENIDO	1
INDICE DE FIGURAS TABLAS Y GRÁFICAS	3
CAPÍTULO	
1. INTRODUCCIÓN	4
2. MARCO TEÓRICO CONCEPTUAL	
2.1. Herbolaria. Antecedentes del uso curativo de las plantas	6
2.1.1. Principios activos –fitofármacos-	7
2.1.2. Extractos de plantas	8
2.1.3. Infusiones	9
2.1.4. Usos de la Infusiones	10
2.2. El Cuachalalate	
2.2.1. Descripción	11
2.2.2. Nombres comunes	11
2.2.3. Clasificación taxonómica	11
2.2.4. Parte utilizada	11
2.2.5. Distribución	11
2.2.6. Falsificación y/o adulteración	12
2.2.7. Usos curativos tradicionales	13
2.2.8. Estudios fitoquímicos y farmacológicos realizados a la planta de cuachalalate	16
2.2.9. Interés biológico de los compuestos identificados en el Cuachalalate	22
2.3. Genotoxicidad	27
2.4. Intercambios de cromátidas hermanas (ICHs)	29

3. OBJETIVOS	31
4. HIPÓTESIS	32
5. MATERIALES Y MÉTODOS	
5.1 Material biológico	33
5.2 Material de laboratorio	33
5.3 Equipo	33
5.4 Reactivos	33
6. RESULTADOS	38
7. DISCUSIÓN	42
8. CONCLUSIONES	45
9. BIBLIOGRAFÍA	46

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Árbol de Cuachalalate	12
Figura 2. Corteza de cuachalalate	12
Figura 3. Localización de la Selva baja caducifolia	13
Figura 4. Alquifenoles de cadena larga	19
Figura 5. Estructuras para los compuestos extraídos de <i>Amphipterygium adstringes</i>	20
Figura 6. Unidades estructurales de los taninos hidrolizables	23
Figura 7. Catequinas. Unidades estructurales de los taninos condensados.	25
Figura 8. La biotransformación de los agentes xenobióticos	28
Figura 9. Los agentes genotóxicos y el daño genotóxico	28

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla I. Presencia de los compuestos mayoritarios de la corteza de cuachalalate	19
Tabla II. Adición en microlitos y en g/ml de la infusión de cuachalalate al 0.6%	35
Tabla III. Cinética de Proliferación Celular, Índice de Replicación e Índice Mitótico	38
Tabla IV. Frecuencia de Intercambios de Cromátidas Hermanas (ICH)	38
Tabla V. Análisis de varianza para las frecuencias de ICH	39

ÍNDICE GRÁFICAS

Gráfica 1. Cinética de Proliferación Celular	39
Gráfica 2. Índice Mitótico	40
Gráfica 3. Frecuencia de ICH	40

Resumen

La infusión de corteza de cuachalalate es la forma más recomendada por la medicina tradicional en México para curar una variedad de enfermedades de la mucosa gástrica como son gastritis, úlceras y cáncer de estómago. La corteza ha sido ampliamente estudiada en varias de sus propiedades como son las: químicas, farmacológicas, citotóxicas cosmetológicas y genotóxicas; sin embargo estos estudios han sido sobre principios activos aislados de la corteza y son pocos los estudios realizados sobre el conjunto de los componentes químicos contenidos en la infusión los cuales pueden estar presentes en un número y cantidad indeterminada.

El motivo de este trabajo fue conocer por medio de la técnica de Intercambio de Cromátidas Hermanas (ICH), la acción genotóxica del conjunto de los componentes contenidos en la infusión de cuachalalate. Para esto, se trataron cultivos de linfocitos humanos con una infusión de cuachalalate preparada al 0.6% la cual se les adicionó en diferentes cantidades: 10, 25, 50, 100 500 y 1000 μl o 6×10^{-5} , 1.5×10^{-4} , 3×10^{-4} , 6×10^{-4} y 3×10^{-3} g/l respectivamente, y se demostró, que la infusión no presentó el efecto de inducción de ICH en ninguna de las concentraciones trabajadas, demostrando que la infusión de cuachalalate no es genotóxica.

1. Introducción

En México el empleo de plantas medicinales o herbolaria para el mantenimiento de la salud es una práctica muy común; sin embargo el conocimiento que se tiene de las propiedades de las plantas medicinales por parte de la población es generalmente adquirido por tradición oral y no se cuenta con la participación de los médicos para documentar la acción de las plantas en pacientes [Navarrete, 2001]. La corteza del árbol conocido como cuachalalate es ampliamente comercializada [SIRE, 2005] ya que es recomendada por la variedad de sus efectos terapéuticos: antiulceroso, gastroprotector, anticanceroso citoprotector y cicatrizante entre otros [Martínez, 1999]. Aunque la acción que se pondera en las plantas medicinales es la farmacológica o terapéutica, los productos de origen vegetal contienen principios activos o fármacos los cuales pueden poseer diversos grados de potencia tanto farmacológica como toxicológica [Chiereghin, 2000]. Existen diversos grados de toxicidad de los principios activos los cuales pueden ocasionar desde una intoxicación aguda hasta una intoxicación crónica o grave; así como daños más sutiles consistentes en efectos sobre moléculas de importancia biológica que sin embargo por tener cierta posibilidad de recambio solo pueden tener ser daños temporales, los cuales en la mayor parte de los casos las células pueden superar, no así el efecto que dichos agentes pueden tener sobre las moléculas de ácido desoxirribonucleico o **ADN** el cual por su papel de portador de la información genética, puede sufrir tal daño que ocasione cambios en la estructura de los cromosomas como: rupturas, deleciones, modificación de las bases, creación de micronúcleos en la célula, o mutaciones que pudieran producir enfermedades graves e incluso conducir a la producción de células malignas [Morales, 1988].

El estudio de los intercambios entre cromátidas hermanas (ICH) permite conocer la respuesta celular ante agentes que lesionan al ácido desoxirribonucleico; ya que se ha observado que la mayor parte de los mutágenos conocidos son capaces de inducir ICH en mayor o menor grado. El intercambio entre cromátidas hermanas es un evento celular normal, que se produce durante la fase S de la mitosis y representa el intercambio simétrico, entre cromátidas hermanas de loci homólogos, de productos de replicación. Estos intercambios se producen por ruptura y reparación posterior del ADN, en los loci que se intercambian durante la fase de síntesis del ciclo celular; ocurren sin pérdida de ADN y sin cambios en la morfología del cromosoma [Morales, 1988].

Por todo lo anterior en este trabajo, se propuso determinar en un cultivo de linfocitos humanos, si algún o alguno de los principios activos contenidos en la corteza de cuachalalate tiene(n) efecto genotóxico y de esta manera inferir algún daño sobre el material genético de las células expuestas a las infusiones y cocimientos de cuachalalate con propósitos curativos; exponiendo cultivos de linfocitos de sangre periférica, a diferentes concentraciones de una infusión y evaluando el número de intercambios de cromátidas hermanas con respecto a un control negativo.

2. Marco teórico conceptual

2.1. Herbolaria. Antecedentes del uso curativo de las plantas

A través de los años, los seres humanos han encontrado en la naturaleza la satisfacción de sus necesidades básicas; casa, alimentación, calzado, vestido, medios de transporte, sabores y olores, no menos importante, es el uso que desde tiempos remotos el hombre hizo de las fuentes naturales para curar sus afecciones [Valdez y cols., 2002; Lozoya,1998].

Las plantas han formado la base de los sistemas tradicionales de medicina, los cuales han existido por cientos de años. Según la OMS aproximadamente, el 80 % de los habitantes a nivel mundial depende de las plantas para su atención primaria de la salud, también predice que para el año 2020, 75% de 7 500 millones de personas que habitarán el mundo, vivirá en países en desarrollo y consumirá solo el 15% de los medicamentos totales del mercado; esto hace pensar que el mantenimiento de la salud dependerá aún más de las plantas medicinales [Romero y cols., 2005].

Se denomina *herbolaria* al conjunto de estudios relativos a las propiedades curativas de las plantas. [Lozoya, 1998]. La Organización Mundial de la Salud definió **la planta medicinal** en 1978 como cualquier planta que en uno o más de sus órganos contiene sustancias, principios activos o fármacos que pueden ser utilizados con finalidad terapéutica. [Cañigüeral y Vanaclacha, 2005].

México ha contado desde épocas prehispánicas con un gran acervo de conocimiento empírico sobre plantas medicinales y sus acciones curativas. En 1542 el médico indígena Martín de la Cruz escribe el *Libellus de Medicinalibus Indorum Herbis – Librito de las yerbas medicinales de los indios*, último de los herbarios medievales y primer herbario colonial; en el se describen 185 plantas ordenadas de acuerdo a la nomenclatura europea del siglo XV, por cada planta se consigna una ilustración de la planta y debajo, el nombre de la enfermedad que cura, seguida de una receta detallada conteniendo el modo de administrarse y en la actualidad se ha seguido documentado el uso de plantas como remedios para el cuidado de la salud y algunas publicaciones etnobotánicas describen el

empleo de los recursos herbolarios y en la actualidad grupos de estudios en las universidades han encontrado en la herbolaria una gran veta de estudio la cual podría agotarse debido a la extinción de los ecosistemas y a la explotación irracional de las especies vegetales conocidas. Cabe mencionar que en la actualidad, ya se puede recurrir al cultivo de tejidos por biotecnología, con lo que se busca además de rescatar especies en extinción, producir solo las sustancias que se consideran útiles [Lozoya 1998].

México ocupa el cuarto lugar a nivel mundial con mayor diversidad vegetal; así mismo se considera que posee más de 4000 especies de plantas medicinales y que de manera empírica utiliza el 80% de la población indígena para tratar problemas de salud, pero que solo el 5% de las plantas utilizadas han sido estudiadas científicamente para validar sus propiedades. A pesar de ello la herbolaria es poco reconocida por sectores importantes de la sociedad entre los que se encuentra el médico, que quizás por falta de conocimientos acerca del tema o por asociación de las plantas medicinales a “cosmovisiones y prácticas” no comprendidas por el modelo terapéutico occidental; no se cuenta con la participación de los médicos que documenten y evalúen la acción de las plantas en pacientes [Romero y cols., 2005; Navarrete, 2001].

En tanto que en México y en general en Latinoamérica la herbolaria comienza a ser tomada con seriedad por los sectores académicos y por las autoridades sanitarias respectivas [OPS, 1999; Romero y cols. 2005] en Europa, la *Fitoterapia* o terapéutica con plantas no es considerada medicina alternativa sino como parte de la medicina convencional. En Alemania el 62% de la población utiliza la herbolaria como primer alternativa para tratar sus enfermedades y en 1997 el 46% de los estadounidenses visitaron a un practicante de medicina alternativa [González, 2004]

2.1.1. Principios activos o fitofármacos

Los principios activos de las plantas medicinales consisten en sustancias que la planta ha sintetizado y almacenado en el curso de su crecimiento. En todas las especies están presentes al mismo tiempo principios activos en los cuales radica la actividad farmacológica y sustancias indiferentes a veces denominadas lastre y que determinan la eficacia de los principios activos reforzando (sinergia), o modulando (antagonismo) su acción. Las acciones terapéuticas que una planta posee son producto de varios principios

activos, de los cuales uno de ellos, el principal, determina las aplicaciones que tendrá la especie en cuestión; pero el grado en que las sustancias lastre o coadyuvantes influyen sobre la acción farmacológica no puede ser evaluado ya que al aislar el o los principios activos principales y probar sus acciones farmacológicas, éstas suelen con frecuencia ser diferentes a las que posee la planta en su totalidad, quedando de manifiesto que es el conjunto de todos los componentes el que confiere a la planta su acción específica. Otra particularidad que poseen las plantas medicinales es su contenido en principios activos, el cual es dependiente tanto del hábitat de la planta como de las técnicas de recolección y preservación de las mismas [Pahlow, 1979; Därr y cols. 1979].

Los principios activos que la planta sintetiza o metaboliza en el transcurso de su crecimiento son almacenado de forma específica en sus diferentes órganos como son: hojas, raíces, tallos, cortezas, flores, frutos y semillas.

Existen dos tipos de sustancias: las que son esenciales para la subsistencia de la planta y son provenientes del metabolismo primario: azúcares, aminoácidos y prótidos, ácidos grasos; y las sustancias provenientes del metabolismo secundario de la planta las el cual no es esencial para su subsistencia, pero que es el que provee la mayoría de las veces moléculas de interés para la Farmacología; éstas moléculas son poco abundantes en la planta y raramente superan el 1% y se denominan metabolitos secundarios; estos se hallan inmersos en las células vegetales junto a otras moléculas estructuralmente relacionadas [Kuklinski, 2000; Cañigüeral y Vanaclacha, 2000].

2.1.2. Extractos de plantas

Los extractos de plantas o partes de plantas, pertenecen a las formas farmacéuticas más antiguas. La separación de una sustancia o una mezcla de sustancias por disolución de cada componente sirviéndose de uno o varios disolventes se denomina extracción. El aislamiento de los componentes principales de la planta es la meta de muchas extracciones pero con frecuencia se obtiene una mezcla de sustancias activas. Cuando la planta ha sido deshidratada para llevarla a una forma almacenable, las sustancias antes disueltas en la planta fresca, precipitan o cristalizan; al embeber la droga con el líquido de extracción se inicia la hidratación de los tejidos celulares devolviendo a las sustancias sus solubilidad, permitiendo la salida de las sustancias activas hacia el disolvente.[Därr y cols. 1979]

La elección de los disolventes a utilizar para la obtención de extractos de plantas depende del interés particular que se persiga; cuando la finalidad de la extracción es la obtención los principios activos de la planta para cuantificarlos y caracterizarlos, se recurre al uso de disolventes de tipo orgánico –y se obtendrán extractos orgánicos- como son alcohol, acetona, éter etílico, hexano, propilenglicol, mezclas de los anteriores, etc., los cuales disuelven de forma selectiva sólo algunas de las moléculas orgánicas contenidas en la planta. Las extracciones que utilizan agua como disolvente -extractos acuosos- conlleva a una extracción poco selectiva y poco cuantitativa de los componentes de la planta, en los que además muchos de ellos se hidrolizan, precipitan o cristalizan conduciendo a la degradación pronta y definitiva del extracto, razón por la cual el consumo de las infusiones es inmediato.

Junto a las extracciones con alcohol (extractos alcohólicos o *tinturas*) y a las extracciones con mezclas de alcohol y agua (extractos hidroalcohólicos), los extractos acuosos son el recurso más socorrido de la terapéutica con plantas medicinales; de esta manera se obtienen “infusiones” también denominadas *tés* o *tizanas*, “decocciones” o *cocimientos* y “*macerados acuosos*” [Brewster y cols. 1982; Därr y cols. 1979; Kuklinski, 2000].

2.1.3. Infusiones

En la actualidad el uso de las infusiones es un redescubrimiento de la fitoterapia y es asociada con lo “verdadero” y con la posibilidad de “huir de la contaminación química y farmacológica” producida en el organismo por los fármacos de síntesis. De esta manera, en la literatura concerniente se encuentra que entre 7 y 8 de cada 10 formulaciones a base de plantas medicinales corresponden a infusiones y cocimientos —infusiones preparadas a temperatura de ebullición por un tiempo más prolongado—. Por lo general las infusiones consisten en preparaciones a base de un disolvente agua, la cual es llevada a temperatura de ebullición que se suspende en el momento de agregar la planta seca o fresca en la cantidad recomendada y posteriormente se realiza una maceración de tiempo variable que puede suspenderse en el momento que la temperatura permita ingerir la infusión o incluso hasta que ésta alcance la temperatura ambiente. [Del Río, 1975; Plantas Medicinales (Naturismo), 1996; Pahlow, 1979; Kuklinski, 2000; Chiereghin, 2000].

La preparación y el uso de tés o infusiones con fines terapéuticos difieren sobre otros extractos como son las tinturas, maceraciones, decocciones; en que estos últimos, ya sea que empleen un disolvente orgánico o un disolvente acuoso o una mezcla de ambos en diferentes proporciones, estos concentran una mayor proporción y cantidad de principios activos debido al tipo de disolvente y al mayor tiempo que permanece en contacto la planta con el disolvente; relegando la responsabilidad de su preparación y dosificación a un verdadero conocedor de las propiedades de las plantas medicinales. Estas diferencias confieren entre otras las siguientes ventajas a las infusiones: 1) su preparación está al alcance de todos, 2) la proporción y concentración de principios activos es la menos y el peligro de una intoxicación es reducido siempre y cuando se sigan las indicaciones precisas por el yerbero o por el fitoterapeuta, 3) por sus propiedades organolépticas –sabor, olor y color- el consumo de infusiones es considerado un agradable retorno a la naturaleza [Pahlow, 1979; Kuklinski, 2000; Chiereghin, 2000].

2.1.4. Usos de la Infusiones

Uso interno y uso externo

Las infusiones tienen la ventaja de poder suministrar los fármacos contenidos en la planta para que estos ejerzan su efecto sobre el órgano blanco, de forma oral o interna y, de forma externa como es el caso de la preparación de *enjuagues* o *antisépticos* para la realización de gargarismos de boca y faringe, para el lavado de heridas y de impurezas de la piel, para la aplicación de enemas gastrointestinales y uterinos, como *apósitos húmedos* para desintegrar costras y abscesos infecciosos; también se pueden tomar *baños parciales* para desinflamar miembros heridos: dedos, brazos, pies y restablecer la circulación sanguínea; con las infusiones se pueden realizar *inhalaciones* para el alivio de las vías respiratorias; y *baños de vapor* para una administración interna y externa; y por último también se pueden realizar *baños completos* (un uso muy popular en zonas indígenas, principalmente en las mujeres que recién han parido), con algunas infusiones también se pueden realizar fricciones, aunque este uso generalmente esté restringido a las tinturas. [Pahlow, 1979].

2.2. El Cuachalalate

2.2.1 Descripción

El Cuachalalate es un árbol, pequeño nativo de México.[Viesca, 1993] que crece de 6 hasta 10 metros de altura y su copa es aplanada. Tiene tronco torcido y corteza grisácea; las hojas compuestas de 5 hojuelas sésiles, aserradas con diente cillos redondeados casi todas abovedadas y se localizan en las puntas de las ramas y sus flores pueden crecer solas o en ramillete originan frutos consistentes en nueces alargadas de 2.5 a 5 centímetros de largo y de color verde pálido. [Martínez, 1996; SIRE, 2005; Rojas, 2001]. Fig.1

2.2.2. Nombres comunes

El Cuachalalate también es conocido como cuachalalá, cuauchalalá, matixerán, volador, macerán, papueco cuacha, cuauchinala y, palo. de rosa [SIRE, 2005].

2.2.3. Clasificación taxonómica [Zamudio, 2005.]

Nombre científico: *Amphyterigium adstringens* Schiede ex Schelch.

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Subclase Rosidae

Orden: Sapindales

Familia: Julianaceae

Género: *Amphyterigium*

Especie: *adstringens*

La misma especie se conoce también bajo los siguientes nombres científicos *Amphyterigium adstringens* (Schlecht.) Schiede, *Hyporterygium adstringens* Schlecht y *Juliania adstringens* Schlecht [Rojas, 2001].

2.2.4. Parte utilizada. [Martínez, 1996; SIRE, 2005; Rojas, 2001]. Fig.2

Los usos terapéuticos del cuachalalate están referidos a la corteza

2.2.5. Distribución [Martínez, 1996; SIRE, 2005; Rojas, 2001].Fig.3

Se encuentra en el bosque tropical caducifolio; en las coordenadas geográficas de

22° 30' a 15° 45' lat. N y de 94° a 106° long. W; en los Estados de Jalisco, Colima, Guerrero, México, Puebla Nayarit, Morelos, Michoacán, Oaxaca y la Cuenca del Balsas

2.2.6. Falsificación y/o adulteración [SIRE, 2005; Zamudio, 2005]

Cytocarpa procera

Quercus spp. (Encino)

Alnus y *Comocladia mollísima*



Figura 1. Árbol de cuachalalate



Figura 2. Corteza de Cuachalalate (Domínguez, 2005)

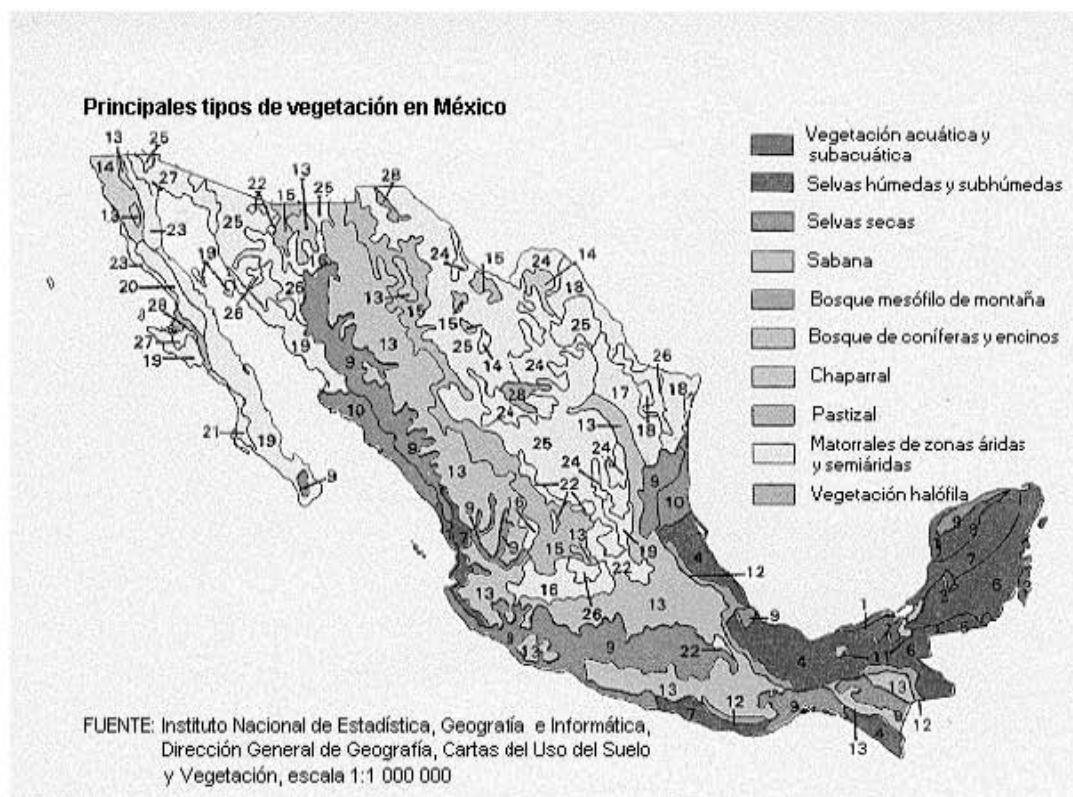


Figura 3. Localización de la selva baja caducifolia o selva seca, lugar donde crece el árbol de cuachalalate. Fuente: <http://mexichannel.net/maps/vegetation.gif>

2.2.7. Usos curativos tradicionales

La corteza de cuachalalate es utilizada ampliamente en diversas formas: infusiones para uso interno y externo; en cocimientos, macerados, tinturas y emplastos o apósitos. Al cuachalalate se le utiliza solo o en conjunto con otras especies para sinergizar alguno(s) de sus efectos [Rojas, 2001].

Los usos terapéuticos puestos al día son el resultado del conocimiento empírico que se han transmitido de forma oral, así como de la incorporación de conocimientos fitoquímicos y farmacológicos obtenidos en los laboratorios de investigación académica. El sitio web del Dr. Mario Rojas Alba [<http://www.tlahui.com/med/med11/cuach/1.htm>] documenta ampliamente y reporta de la siguiente manera los usos medicinales del cuachalalate:

Problemas circulatorios

Tal vez por su efecto astringente, la corteza de cuachalalate se emplea en algunos problemas de la sangre y de la circulación. La gente le atribuye un efecto purificador y

desintoxicante sanguíneo, además de curar las várices y úlceras varicosas.

Enfermedades bucales

Para los fuegos y úlceras de la boca, hacer buches con la infusión de la corteza. De manera similar al uso vulgar del encino, el cuachalalate se prepara en cocimiento con unos 50 gr. de corteza para endurecer las encías. Para los dolores de muelas y contra la estomatitis.

Enfermedades gastrointestinales

En México se toma la infusión de la corteza de cuachalalate junto con árnica para el tratamiento de la inflamación del estómago, la gastritis crónica y de la úlcera gástrica. Popularmente se emplea además para aliviar dolores gástricos y para limpiar el estómago. El cocimiento se ha utilizado en el tratamiento vulgar del cáncer de estómago, se recomienda el extracto simple para el tratamiento del cáncer del tubo digestivo.

Infecciones

Se recomienda tradicionalmente contra la fiebre tifoidea, el paludismo, las fiebres intermitentes, la calentura (fiebre) y la gangrena. El doctor Leopoldo Hernández, en referencia de Maximino Martínez, encontró una reacción favorable del cuachalalate en el tratamiento del tifo.

Afecciones urinarias

Para las afecciones de los riñones se bebe diariamente y durante 20 o 30 días, el cocimiento de la corteza de cuachalalate junto con el palo de 3 costillas. En Morelos se puede agregar además la cola de caballo (*Equisetum hyemale* L.) para mejorar su efecto curativo en las enfermedades urinarias.

Heridas, granos y enfermedades de la piel

El cuachalalate es un magnífico cicatrizante para el tratamiento de las heridas externas, heridas antiguas, y llagas, se emplea la infusión de la corteza para lavar la herida.

Durante la revolución mexicana, los guerrilleros zapatistas en el Estado de

Morelos, utilizaron el polvo del cuachalalate para tratar las heridas de bala o de arma blanca. La corteza en polvo, se aplica también en las mataduras de los animales de trabajo, después de haber lavado la herida. Los granos se curan bebiendo del cocimiento o aplicación de la goma blanca o la resina de la corteza, de la misma forma se pueden atender las llagas cutáneas, tumores o cáncer de la piel, para la caída del cabello y manchas en la piel.

Enfermedades de la mujer

Para los granos de los genitales, se usa la cocción de cuachalalate junto con conteloloache, árnica y sal, para hacer lavados según sea necesario. El cocimiento de la corteza se utiliza también para lavados vaginales en los casos de vaginitis, flujos vaginales, frío, fiebre puerperal, infecciones de la matriz o de los ovarios. Las parteras tradicionales utilizan el cuachalalate para el tratamiento del *cachán* o *cachanes*, enfermedad que pueden contraer las puérperas como consecuencia de la “entrada de frío” al interior del cuerpo. El extracto simple se emplea para el tratamiento de los quistes de ovario y del útero.

Padecimiento hepatobiliares

El cocimiento de la corteza de cuachalalate se emplea también en diversos padecimientos del hígado y vesícula. Para las enfermedades del riñón, incluyendo dolor e inflamación, se ingiere, el cocimiento de cuachalalate y el palo de tres costillas, tres veces al día.

Afecciones del pulmón y vías respiratorias

La corteza en cocimiento hasta pintar el agua, se toma para en caso de afecciones respiratorias, catarros, tos, inflamación de anginas, resfriados, y tuberculosis. Para la tos y las afecciones pulmonares, se hierva la cáscara, hasta que pinte el agua, se endulza y se toma cuatro veces al día, el tiempo necesario o se toma como agua de uso. Para la tos también se puede preparar un jarabe con la corteza de cuachalalate, una “tripita” de cautecomate, árnica, alcohol, miel de abeja y bagazo de caña, para tomar una cucharada cada hora.

Padecimientos de músculo-esquelético

Se reconoce en el cuachalalate un efecto analgésico, popularmente se utiliza para aliviar el dolor de cintura, cabeza, espalda o pulmones, hernia, reuma o punzada.

Otros padecimientos

Para las afecciones del hígado. Se le atribuye también un efecto antidiabético.

Contraindicaciones

No se conocen reportes de intoxicaciones graves por su uso terapéutico tradicional.

2.2.8. Estudios fitoquímicos y farmacológicos realizados a la planta de Cuachalalate

La corteza de Cuachalalate ha sido estudiada desde hace más de 60 años aproximadamente. El diccionario geográfico, histórico, biográfico y lingüístico del Estado de Guerrero de 1942, ya mencionaba el alto contenido de *taninos* en la corteza de cuachalalate y su uso como astringente [Navarrete, 1982].

Maximino Martínez (1996) tiene registros de estudio de Cuachalalate realizados en los años 40's (Aceves, E.1943; Tempesta, J. 194?) pero no aclara que compuestos fueron estudiados. En 1954 en la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas se realizó el “Estudio químico de la corteza de *Juliania adstringens* Schiecht linnae (cuachalalate)” en el cual se llevó a cabo un estudio sistemático determinando humedad, cenizas totales y fibra cruda en corteza; así como un procedimiento de extracción sucesiva utilizando solventes orgánicos de naturaleza polar diferente entre si; el cual quizás debido a la tecnología de la época solo logró caracterizar *compuestos tánicos* en una concentración de 7.4% [Navarrete, 1982].

En 1962^a González y colaboradores llevan a cabo dos investigaciones con motivo de la actividad anticancerígena que también se le atribuía al Cuachalalate ya que existía el antecedente de un estudio realizado y que mostraba cierto grado de actividad anticancerígena en ratones y en embriones de pollo y también al deseo de encontrar más componentes químicos en la planta. En el primer trabajo –Phytochemical Investigación of

Amphipterygium adstringens-, este equipo de trabajo realizó una extracción continua a la corteza de cuachalalate partiendo de los extractos con los siguientes solventes: eter de petróleo, metanol y agua; para identificar los componentes contenidos en las fracciones recabadas, los purificaron y por medio de cromatografía y técnicas de infrarrojo caracterizaron los siguientes compuestos químicos: **fitoesteroles, glicósidos, taninos condensados, saponinas –sarsapogenina-** y **azúcares:** D-xilosa, D-glucosa, D-galactosa, D-ramanosa, más un “**ácido orgánico**” que no lograron identificar. De las fracciones obtenidas, utilizaron aquellas que contenían saponinas y una fracción acuosa que contenía una saponina esteroidal -sapogenina- y probaron su actividad sobre adenocarcinoma mamario inducido en ratón. La actividad antineoplásica se evaluó sobre el porcentaje de inhibición del crecimiento del tumor. En general fracciones provenientes de todos los extractos mostraron actividad inhibitoria, pero fue el extracto metanólico y sus saponinas el que mayor actividad inhibitoria mostró (54%). Aunque solo una de las fracciones del extracto acuoso mostró actividad inhibitoria (del 49%); ésta se atribuyó a la presencia de la saponina esteroidal –sarsapogenina-. [González y cols. 1962^a; González y cols. 1962^b]. A pesar de que en el trabajo de Martínez y Flores (2002) se menciona que no se han identificado saponinas en la corteza de cuachalalate, el valor científico del efecto inhibitorio sobre el crecimiento del adenocarcinoma del extracto metanólico del cuachalalate reforzó la recomendación del cuachalalate para el tratamiento del cáncer, siendo éste trabajo el único sustento científico que venía respaldando esta actividad biológica, hasta que en un reciente estudio demostró la actividad citotóxica de los siguientes compuestos provenientes del extracto hexánico: **ácido masticadienónico, ácido 3 Δ -hidroximasticadienólico**, los cuales inhibieron el crecimiento de 5 líneas celulares de cáncer humano; de un derivado del ácido masticadienónico el **ácido 24,25S-dihydromasticadienónico** y del **ácido masticadienólico** que a su vez mostraron mayor actividad inhibitoria -en comparación con los dos anteriores- sobre células de cáncer de colon [Oviedo y cols. 2005].

En 1981 [Domínguez y cols] identificaron lo que pudiera haber sido el ácido orgánico que González y cols.(1962^a) no pudieron caracterizar: la fórmula molecular correspondiente al **ácido instipolinácico** y concluyeron que éste correspondía a un isómero

del **ácido dihidroisomasticadienónico** y trazas del **ácido deshidroinstipolinácico** correspondiente al isómero geométrico del **ácido isomasticadienónico**.

En 1982 Navarrete realizó un nuevo estudio químico de la corteza de cuachalalate en el que se propuso aislar la mayor cantidad de sustancias posibles, determinar su estructura, así como un estudio farmacológico preliminar de las mismas, obteniendo como compuestos mayoritarios y a partir de los extractos orgánicos de hexano y acetona, 2 compuestos encontrados anteriormente solo en el género de las anacardiáceas: los ácidos **3 α -hidroximasticadienónico** y el **ácido masticadienónico** de los cuales, el ácido masticadienónico presentó efecto hipocolesterolemiantes significativo. [Navarrete, 1982].

Estudios posteriores han proporcionado una mayor claridad en aislamiento y caracterización de los compuestos contenidos en el cuachalalate y en la actualidad se tienen al menos los siguientes compuestos: **ácidos masticadienónico, 3 α -hidroximasticadienónico, instipolinácico, cuachalálico, isomasticadienónico, 3-epihidroximasticadienónico, oleanólico, epioleanólico y β -sitosterol**. Navarrete (1986) también aisló una mezcla de **ácidos anacárdicos** y otra de **aldehídos anacárdicos** de los cuales posteriormente se identificaron: los ácidos **6-pentadecilsalicílico, 6-heptadecilsalicílico, 6-nonadecilsalicílico, 6-hexadecilsalicílico, 11-heptadecilsalicílico, 6-octadecilsalicílico, 6-eicodécilsalicílico, 6-[16'(Z)eicodécenil]-sálico** provenientes de la mezcla de ácidos anacárdicos, y los aldehídos anacárdicos: **6-octadecilsalicilaldehído, 6-eicodécilsalicilaldehído** y el **6-docodécilsalicilaldehído**. Los aldehídos anacárdicos fueron evaluados en su actividad hipocolesterolemiantes con resultados positivos. Más aun, en la década de los 90's nuevos triterpenoides fueron aislados: **27-acetoxi-3 α ,15 α -dihidrodammarano-12,24-dieno** y los tirucalenos **ácidos: 3 α -hidroxi-6-oxo-7,24Z-tirucaladien-26-oico, 3,7-Dioxo-8,24Z-tirucaladien-26-oico, 3 α -hidroxi-7-oxo-8,24Z-tirucaladien-26-oico, 7,11-Dioxo-3 α -hidroxi-8,24Z-tirucaladien-26-oico** y **3,8-Dioxo-7 β -hidroxi-7,9-cycro-7,8-seco-24Z-tirucaladien-26-oico, ácido 3-dodecyl-1,8-dihidroxi-2-naftóico, ácido 3 Δ -hidroximasticadienónico, ácido 24,25S-dihidromasticadienónico, ácido masticadienólico**. Algunos de estos compuestos se muestran en las figuras 4 y 5. Rosas (2005), proporciona a su vez, datos de la presencia de

compuestos mayoritarios en diferentes extractos de cuachalalate (tabla I) así como de su contenido. [Navarrete, 1982; Domínguez y cols., 1981; Navarrete, 1986, Watson y cols. 1987; Soriano-García y cols., 1987; Calzada, 1989; Pérez y cols. 1993; Mitsuko y cols.2003; Rivero-Cruz y cols. 2005; Oviedo y cols.2005^a].

Tabla I. Presencia de los compuestos mayoritarios de la corteza de cuachalalate en los extractos acuoso, metanólico y hexánico.

Extracto (305 mg)	Ácido masticadienónico (mg)	Ácido 3 α -hidroximasticadienónico (mg)	Ácido anacárdicos (mg)
Acuoso	-	-	8.6
Metanólico	-	7.1	25.7
Hexánico	10.1	4.5	70.6

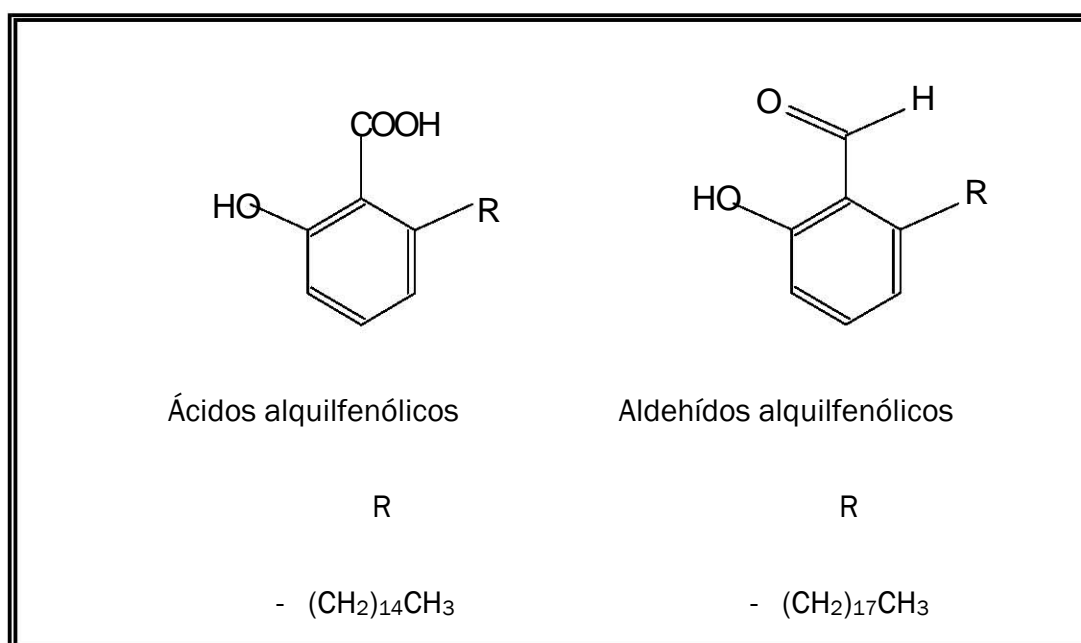


Figura 4. Alquilfenoles de cadena larga. (Benítez,1998)

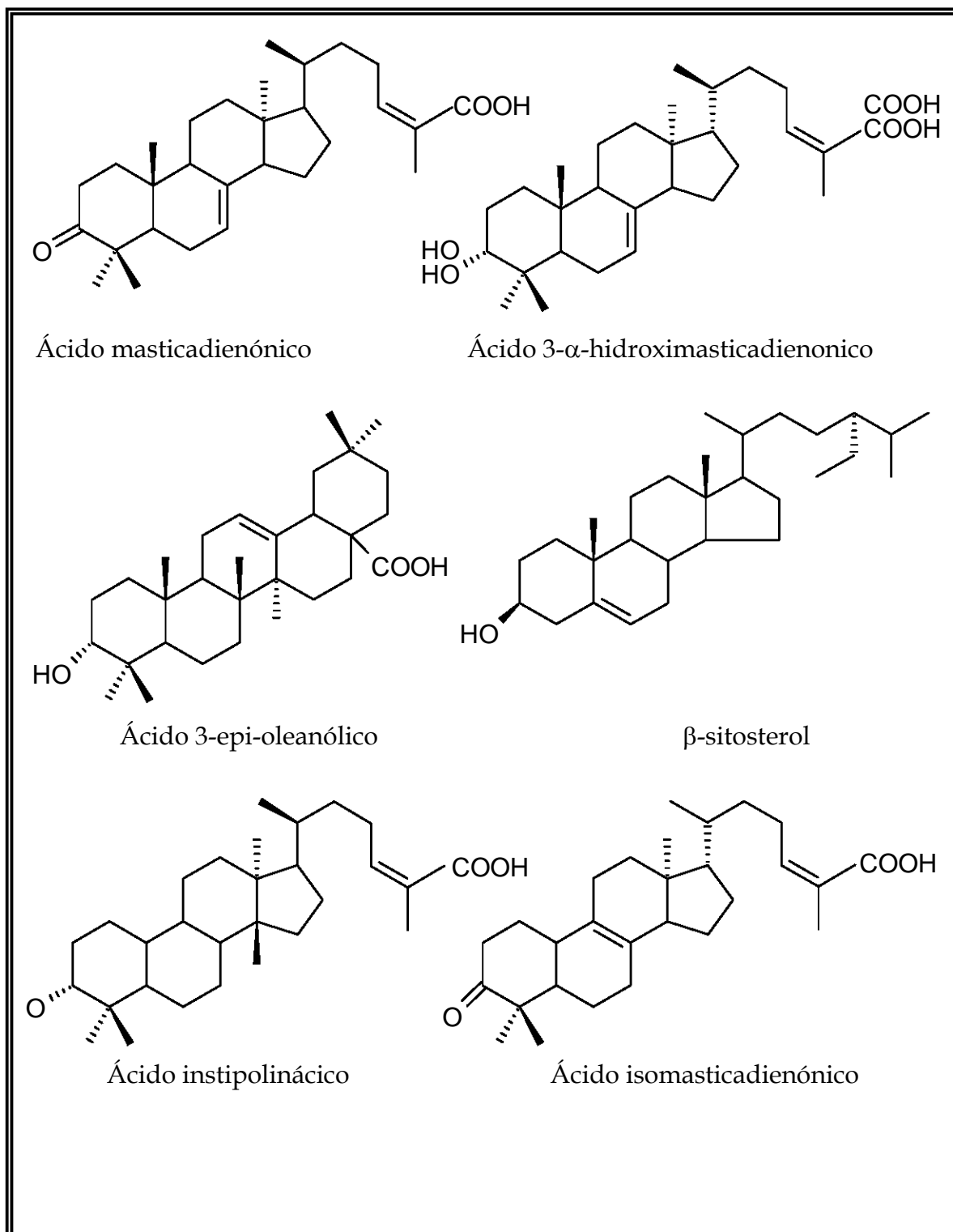


Figura 5. Estructuras para los compuestos extraídos de *Amphipterygium adstringens* (Rosas, 2000).

En cuanto a estudios farmacológicos, aparte de los ya mencionados, el cuachalalate ha sido objeto de varios estudios que se han realizado tanto sobre extractos orgánicos ricos en compuestos triterpénicos así como sobre infusiones de composición poco precisa y se han obtenido resultados positivos como los siguientes efectos: antiulceroso, gastroprotector, epitelializante, cicatrizador y restaurador de la mucosa gástrica efectos atribuidos principalmente a los compuestos triterpénicos como son los ácidos 3α -hidroximasticadienónico, 3-epi-oleanólico y β -sitosaterol; hipoglucemiante propiedad tanto de los ácidos másticos como de los ácidos anacárdicos, fungicida encontrado en la infusión así como en el extracto etanólico; anti-inflamatorio de los ácidos masticadienónico y 3α -hidroximasticadienónico; inmunomodulador de la infusión; citoprotector sobre lesiones gástricas de la infusión, del extracto metanólico y del ácido instipolinácico; antimicobacterial de los triterpenos; cosméticas como son: cicatrizante sobre lesiones cutáneas (epitelio), fotoprotectoras (filtro solar) y emolientes atribuidas a los compuestos polifenólicos; contra la caída del cabello de los triterpenos y tirucalenos y por último el efecto antineoplásico de los ácidos masticadienónico y 3α -hidroximasticadienónico. [Aguirre 1983; Arroyo, 1994; Benítez, 1998; Calzada, 1989; Fernández, 2003; Martínez, 1994; Martínez, 1986 Oviedo, y cols. 2004b, Silva, 1990 *cit. por.* Zamudio, 2005; Zacarías, 1993; Oviedo, y cols. 2005^a; Casillas, 1999; Rivero-Cruz y cols. 2005]

La búsqueda de fármacos con actividad antineoplásica ha permitido a *Amphiterygium adstringens* seguir siendo objeto de estudio y éste se ha extendido al área de la citogenética donde con la finalidad de evaluar el efecto genotóxico de sus componentes, Martínez y Flores (2002), evaluaron la acción anticlastogénica –clastógeno es un agente físico o químico que produce rupturas cromosómicas- del extracto hexánico del cuachalalate sobre la inducción de micronúcleos en eritrocitos producidos por la ifosfamida, el estudio se realizó en eritrocitos de ratón y en el extracto hexánico se probó la presencia de los ácidos masticadienónico y 3α -hidroximasticadienónico y el resultado de su estudio concluyó: 1) que cuando se aplicó solo el extracto a los ratones, este no fue citotóxico y no fue clastogénico y 2) que la aplicación del extracto hexánico en compañía de la ifosfamida crea un sinergismo (las autoras infieren que el extracto podría transformar a la ifosfamida hacia metabolitos farmacocinéticamente más rápidos) produciendo un

efecto citotóxico que, interpretan las autoras como genoprotector en la medida de que al matar células, éstas ya no podrán dividirse y producir micronúcleos. Otra explicación que encuentran podría ser la existencia de un mecanismo que induzca a las células (por medio del extracto hexánico) a entrar en apoptosis y así evitar que se produzcan los micronúcleos. Otro estudio de genotoxicidad fue el realizado por Domínguez (2005), el que evaluó la actividad genotóxica del ácido 6-nonadecilsalicílico aislado de la corteza de cuachalalate y de su ester metílico con la prueba de micronúcleos. La prueba se realizó en sangre periférica de ratones, concluyendo que ninguno de los dos compuestos es genotóxico a las dosis ensayadas, pero que el ácido 6-nonadecilsalicílico sí presentó un efecto citotóxico dependiente del tiempo de exposición y de la dosis.

También se ha recurrido la técnica de intercambios de cromátidas hermanas (ICH) en la búsqueda del efecto genotóxico o antigenotóxico del cuachalalate. Quintanar (2005) evaluó el efecto genotóxico del extracto hexánico del cuachalalate en cultivo de linfocitos humanos por medio de la técnica de ICH, y los resultados mostraron que a las dosis probadas el extracto no incrementó la frecuencia de ICH y que por lo tanto se prueba que los componentes presentes en el extracto hexánico del cuachalalate no son genotóxicos.

2.2.9. Interés biológico de los compuestos identificados del cuachalalate

Taninos

Los taninos son metabolitos secundarios de las plantas consistentes en polímeros fenólicos de alto peso molecular, hidrosolubles y con capacidad para formar complejos estables con proteínas, polisacáridos, ácidos nucleicos, esteroides, alcaloides, saponinas y metales. Están distribuidos ampliamente en la naturaleza y con frecuencia en grandes concentraciones como es el caso del cuachalalate en el cual, a la corteza se le han determinado hasta 7.4% de concentración de taninos. Debido a su diversidad y complejidad estructural han sido poco estudiados, aunque se espera que en un futuro próximo y con ayuda del desarrollo de métodos de investigación estructural, se pueda estudiar de forma individual la actividad para cada tanino. Los taninos se clasifican sobre la base de su origen químico en dos grandes grupos: taninos hidrolizables y taninos condensados estos últimos también llamados proantocianidinas, catéquicos, poliésteres de ácido gálico y polifenoles, algunos autores reconocen un tercer grupo que es el de los taninos complejos, los cuales

son estructuras intermedias entre las dos categorías clásicas.

Los **taninos hidrolizables** son poliésteres de una azúcar, generalmente glucosa o de un poliol y un número variable de ácidos fenólicos. Son hidrolizables por ácidos, álcalis y enzimas. Fig.6

Los **taninos condensados** consisten de oligómeros y de polímeros flavánicos. Están constituidos por unidades de flavan-3-oles o catequinas unidos entre sí por enlaces C-C; en comparación con los taninos hidrolizables, sus moléculas son más resistentes a la ruptura y por lo tanto a la hidrólisis ácida o básica, carecen de osas y su estructura está más relacionada con los flavonoides. [Del Fresno, 1999; Kuklinski, 2000] Fig.7

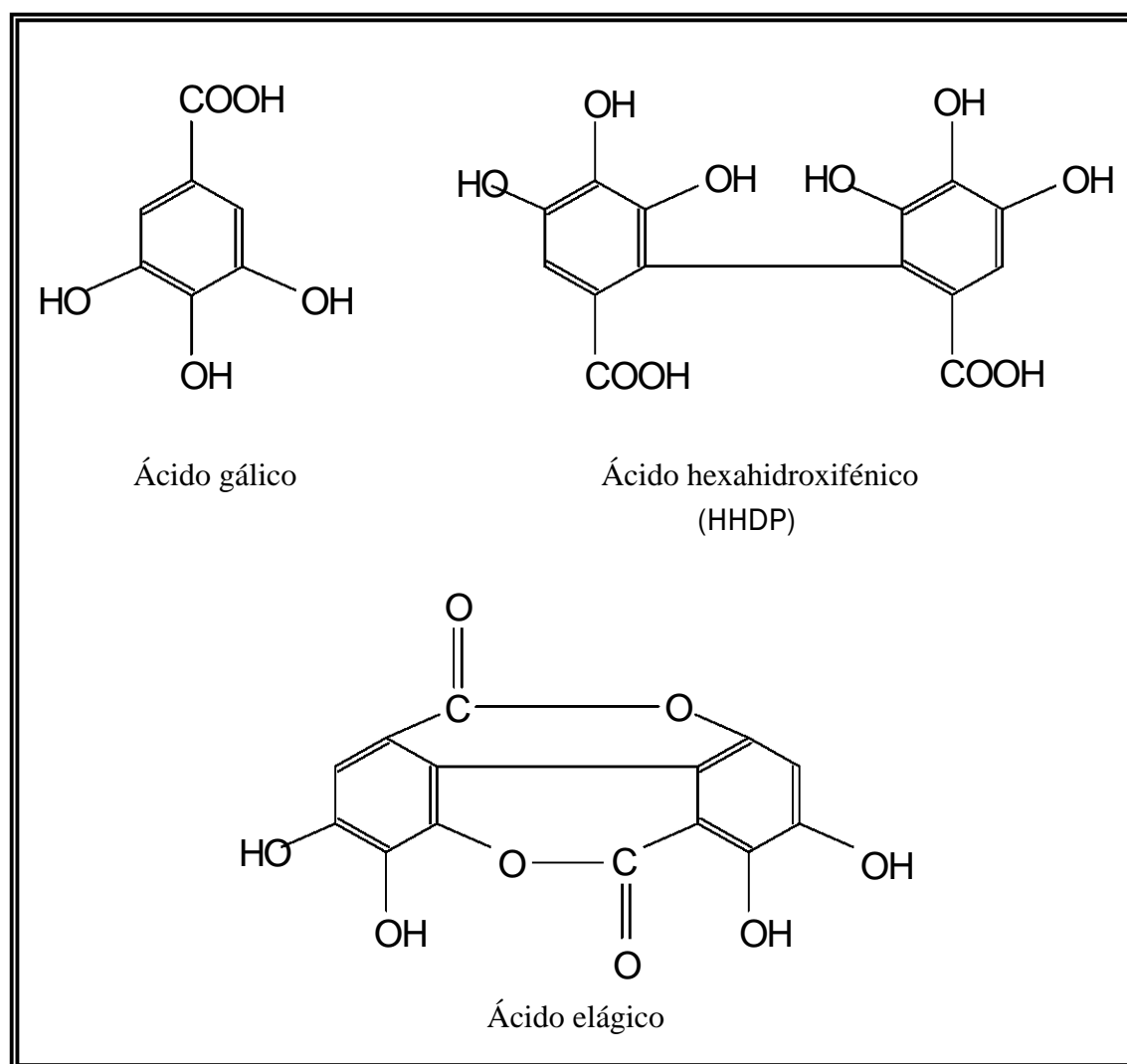


Figura 6. Unidades estructurales de los taninos hidrolizables.

El interés de los taninos radica en su interacción con las macromoléculas la cual se establece con interacciones hidrófobas y puentes de hidrógeno entre los grupos fenólicos y las proteínas de otros polímeros; pero además deben establecer enlaces covalentes para asegurar la estabilidad en el tiempo. Para que se establezcan estos enlaces es necesario que la masa molecular del tanino esté comprendida entre límites definidos ya que si ésta es demasiado elevada la molécula no puede intercalarse entre los espacios interfibrilares y si es demasiado baja la molécula de tanino se intercala aunque no pueda formar un número suficiente de enlaces como para asegurar la estabilidad de la combinación. Ésta propiedad explica varios de sus usos, al unirse con proteínas de la piel y de las mucosas se lleva a cabo una especie de curtido disminuyendo la permeabilidad de las capas superficiales y protegiendo a las capas inferiores del epitelio, de ahí su empleo en uso externo como cicatrizante y en el tratamiento de quemaduras, también explica la astringencia de los taninos, puesto que estos al precipitar con las glicoproteínas de la saliva hacen perder a ésta sus propiedades lubricantes, esta astringencia los hace útiles en cosmetología en la preparación de tónicos y lociones, aclaran también la inhibición de los enzimas por parte de los taninos que se combinan con la fracción proteica de aquella. En uso interno, los taninos son antidiarreicos y disminuyen el peristaltismo, tienen acción antiséptica por lo que son útiles en uso externo contra dermatosis. Por su capacidad de precipitar con metales pesados y con alcaloides, son contraveneno de los mismos; son vasoconstrictores poderosos por lo que se emplean en tratamientos de várices y hemorroides. El aislamiento de taninos puros ha permitido ensayar otras acciones farmacológicas muchas de ellas relacionada con su actividad antioxidante y la captura de radicales libres, que ha sido investigado en varios sistemas experimentales: inhibición de la peroxidación de lípidos en mitocondrias o microsomas de hígado de ratón; inhibición de citotoxicidad de hepatocitos, ejercida por taninos elágicos y algunos poliésteres de glucosa. Los taninos ejercen también un efecto hipocolesterolemia y ahora también se propone el estudio de los taninos como agentes anticancer, antivirales, fotoprotectores, antioxidantes, cicatrizantes, antimicrobianos e inhibidores de proteasas. [Del Fresno, 1999; Kuklinski, 2000]

En un estudio de distribución y farmacocinética de taninos condensados, utilizando ratones como biomodelos, los taninos condensados obtenidos a partir de extractos acuosos de dos cortezas diferentes –*Pinus caribaea*, *Casuarina equisetifolia*- purificados y

marcados radioisotópicamente y administrados por vía oral y por vía endovenosa presentaron una rápida biodistribución hacia diferentes órganos y tejidos, con manifestaciones de un importante acúmulo en estómago e intestinos y con una notable capacidad de los taninos para atravesar barrera hematoencefálica donde se presume le confieren protección al órgano ante la peroxidación lipídica.[Santana y cols. 2002]

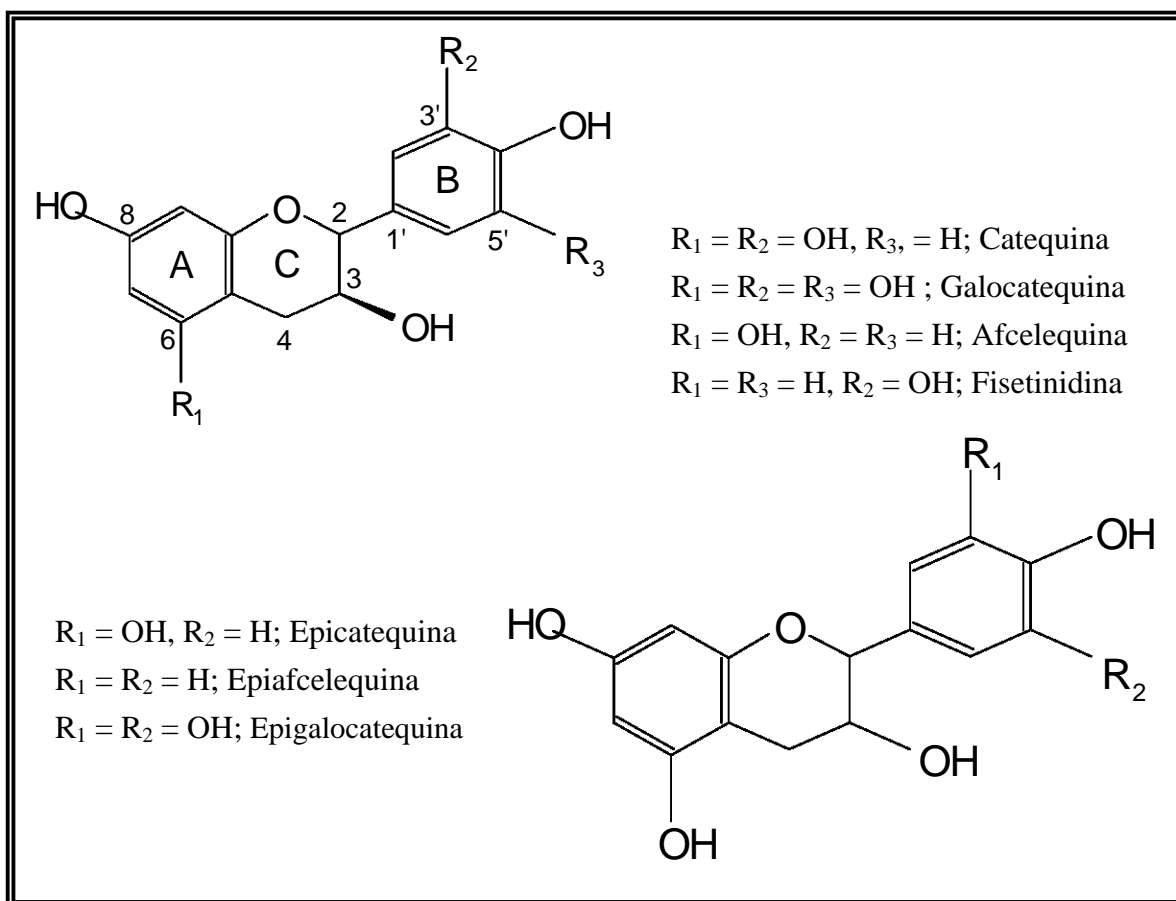


Figura 7. Catequinas. Unidades estructurales de los taninos condensados.

Ácidos másticos y tirucalenos

Son compuestos isoprenoides derivados del escualeno por la vía del ácido mevalónico; su estructura tetracíclica se relaciona con el núcleo esteroide **perhidrociclopentanofenantreno**, pertenecen a los metabolitos secundarios del grupo triterpenos y esteroides. El interés de los investigadores por los triterpenos y esteroides ha conducido al descubrimiento de varias acciones como son la prevención del daño hepático por CCl_4 por parte de la genticulina de *Gentiana favomaculata*, ácido oleanólico,

curcubitacinas B y E etc.; o del daño pancreático producido por NO y ejercido por el ácido fusídico; o de las acciones antineoplásicas del ácido hiptático A de *Hyptis capitata*, del ácido plumérico de *Plumeria acutifolia*, del ácido manwuweizco de *Schisandra propinqua* etc.; de las propiedades antiinflamatorias de las papirogeninas de *Tetrapanax papyrifera* y de los ursanoides de la resina de *Boswellia serrata*. [Del Fresno, 1999]

A pesar de que los ácidos másticos y tirucalenos encontrados en el cuachalalate provienen de un grupo de metabolitos poco estudiados, el estudio de estos principios activos ha sido de un gran alcance y, a la lista anterior, se pueden agregar con toda seguridad las acciones de los ácidos másticos y sus isómeros así como de los tirucalenos – mencionados e ilustrados con anterioridad- encontrados en *Amphiterygium adstringens*: hipocolesterolemiante, antiinflamatorias, cicatrizantes, citotóxicas, antineoplásicas, antiulceroso, gastroprotector, citoprotector, fungicida. [Navarrete, 1982; Calzada, 1989; Martínez, 1986; Oviedo, Ramírez y cols. 2004; Fernández, 2003; Mitsuko y cols. 2003; Oviedo y cols, 2005b; Oviedo y cols., 2004a Aguirre 1983; Benítez, 1998; Silva, 1990; Martínez, 1994; Zacarías, 1993; Casillas, 1999; Rivero-Cruz y cols. 2005]

Alquilfenoles de cadena larga

Los alquilfenoles son un grupo de productos naturales aromáticos del tipo C_6-C_n . Son metabolitos secundarios provenientes del ácido sikímico. Se encuentran presentes en algunas especies de varias familias: Anacardiáceas, Compuestas, Ginkgoaceas, Leguminosas y Miristicaceas, así como en algunos líquenes, algas y hepáticas.

Los alquilfenoles aislados del cuachalalate también llamados ácidos 6-alquilsalicílicos, consisten una mezcla de ácidos fenólicos ácidos anacárdicos con cadenas laterales $C_{16,17,18,20}$ y otra de aldehídos fenólicos (aldehídos anacárdicos con cadenas laterales $C_{18,20,22}$) obtenidos del extracto hexánico del cuachalalate, resultaron ser nuevos productos naturales y los aldehídos anacárdicos en particular se describieron por primera vez en la naturaleza [Navarrete, 1989; Calzada 1989, Mata, 1993].

El interés biológico de los alquilfenoles radica en sus acciones molusquicida, fungicida, antibiótica, antiinflamatoria, antimicrobiana, citotóxica e inhibitoria de la prostaglandina –sintetasa. [Calzada, 1989]. Un estudio de ácidos anacárdicos provenientes de *Ginkgo biloba* mostró actividad inhibitoria de la glicerol-3-fosfato-deshidrogenasa en 3

modelos biológicos: *Bacillus subtilis*, *Lipomyces starkeyi* y células 3T3 L-1, enzima requerida para la síntesis de triglicéridos –lípidos- y en consecuencia como una posibilidad de fármaco para la reducción de peso; este mismo estudio mostró la actividad inhibitoria del crecimiento de una cepa de *Bacillus subtilis*. [Masatsune, y cols., 1997]. La actividad citotóxica del ácido anacárdico ácido 6-Pentadecilsalicílico y del ácido ginkgoico [ácido 6-(8-Z-pentadecenil)] salicílico, obtenidos del extracto alcohólico de *Ozoroa insignis*, fue estudiada in vitro al someter a células provenientes de tres procesos cancerosos humanos: adenocarcinoma, mamario, carcinoma hepatocelular, y carcinoma primario de vejiga, al extracto metanólico con resultados positivos. [Rea y cols.2003 Otros estudios han evaluado también la actividad antiinflamatoria y la actividad inhibitoria sobre la producción de radicales superóxido. [Olumayokun, y cols. 2004; Noriyoshi y cols., 2003]

A la mezcla de ácidos anacárdicos y de anacardaldehydos así como los compuestos puros de los mismos obtenidos, del cuachalalate, se les determinó toxicidad contra el crustáceo *Artemia salina*, encontrándose que en ninguno de los casos examinados fueron tóxicos a concentraciones inferiores a las 1000 ppm. [Calzada, 1989]

En este mismo trabajo se evaluó el efecto hipocolesterolemia de una de las mezclas de ácidos anacárdicos y de los anacardaldehydos con resultados marcadamente hipocolesterolemia para los últimos. [Calzada, 1989]

2.3. Genotoxicidad

Los productos de origen vegetal contienen principios activos los cuales al ser sustancias extrañas al organismo (xenobióticas), una vez que son absorbidas y metabolizadas por el organismo, pueden pasar de largo por el organismo sin causar ningún daño si se trata de metabolitos estables, en caso contrario; los productos metabólicos del xenobiótico pueden consistir en compuestos potencialmente reactivos, capaces de producir daño a los tejidos, despertar respuestas inmunológicas o interactuar con los ácidos nucleicos Fig. 8este último caso puede conducir a daños –genotoxicidad- de diversa índole en los cromosomas como son: rupturas, deleciones, modificación en el orden de las bases, enlaces cruzados con otras moléculas, creación de micronúcleos, etcétera; mutaciones que al ocurrir en las células germinales pueden ser heredables y en el menor de los casos producir gametos estériles en el individuo portador; sí las mutaciones se producen en

células somáticas, el individuo puede desarrollar enfermedades crónico degenerativas o bien iniciar procesos cancerosos Fig.9.[Morales, 1988; Rodríguez, 1994]

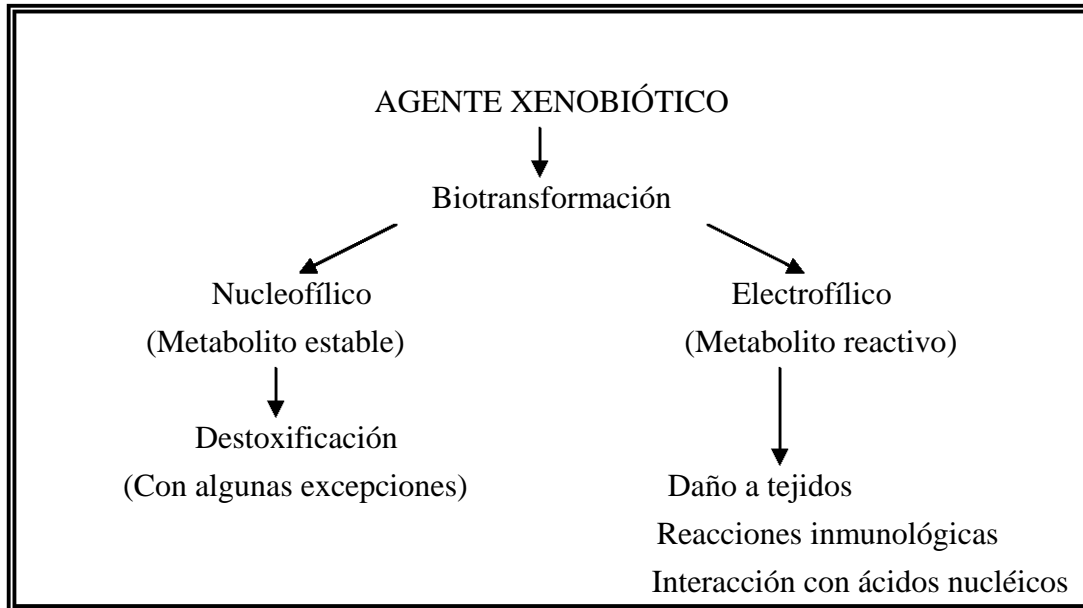


Figura 8. La biotransformación de los agentes xenobióticos. [Rodríguez, 1994]

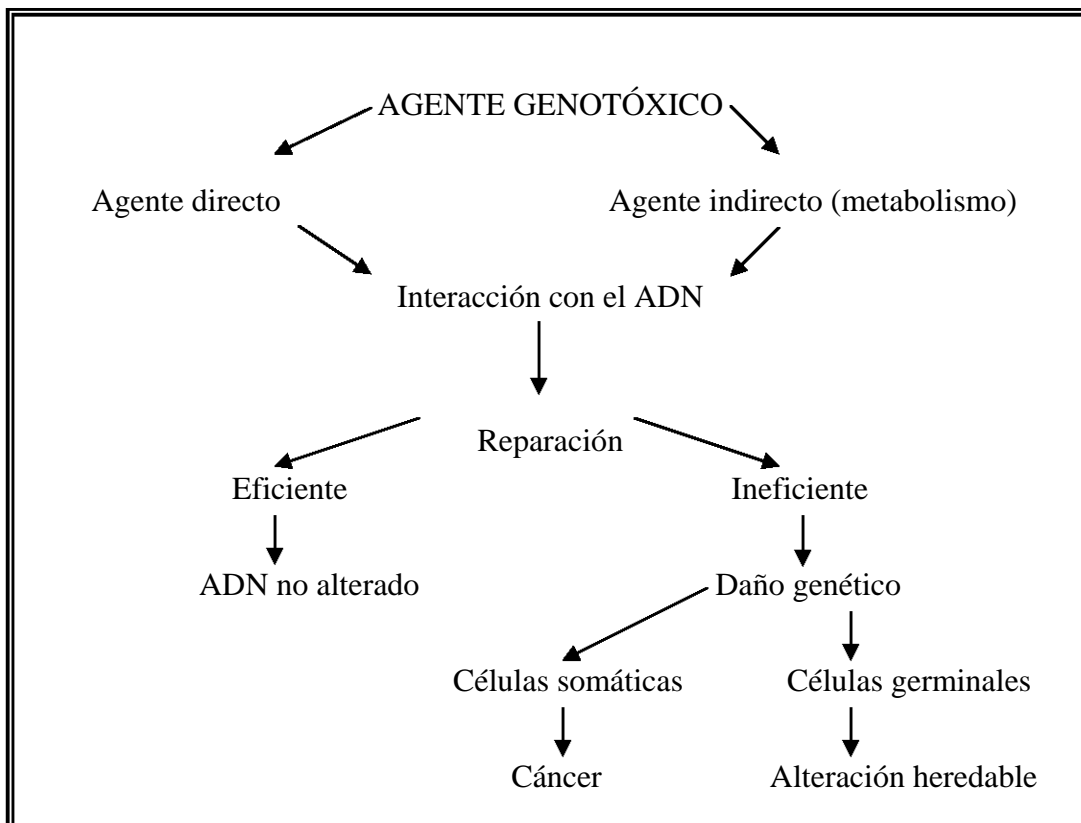


Figura 9. Los agentes genotóxicos y el daño genotóxico inducido. [Rodríguez, 1994]

Para detectar sustancias potencialmente mutagénicas, se han ideado sistemas de prueba que incluyen pruebas tanto *in vivo* como *in vitro* y ambos tipos de pruebas tienen su fundamento en la exposición a diferentes concentraciones de la sustancia en cuestión a células en crecimiento; es decir en división celular. Las pruebas *in vivo* tienen la ventaja de reproducir con mayor fidelidad los efectos genotóxicos y permiten que estos sean activados o inactivados metabólicamente; los sistemas *in vitro*, se consideran sistema cerrados donde no participa el metabolismo de un organismo vivo y en donde cualquier cambio observable sólo puede ser atribuible a la sustancia en prueba. Aunque en la actualidad existen más de 150 sistemas de prueba, los más utilizados son los que detectan mutaciones, rompimientos cromosómicos o clastogenia y la recombinación mitótica o intercambios de cromátidas hermanas. [Rodríguez, 1994]

2.4. Intercambios de cromátidas hermanas (ICH)

Los intercambios de cromátidas hermanas consisten en intercambios recíprocos de secuencias de loci homólogos entre las cromátidas en el estado de cuatro filamentos y que suceden durante la replicación del ADN. [Das, 1988; Morales 1988]. Se ha propuesto que ocurre donde se bifurca la cadena doble de ADN de tal manera que las lesiones que no se reparen antes de la síntesis de ADN sean las causantes de los ICH; estos ocurren sin pérdida de ADN y sin cambios en la morfología del cromosoma. Los ICH se han observado en las células de todos los organismos estudiados, lo que sugiere que los ICH son la expresión de un fenómeno fundamental para la célula y se considera que no son letales para ella. Un aspecto interesante es que la mayor parte de los mutágenos conocidos, son capaces de inducir ICH en mayor o menor grado, de ahí que la inducción de ICH se haya convertido en una herramienta de alta sensibilidad para la detección de mutágenos y así conocer la respuesta celular ante agentes que lesionan al ADN. El análisis de los ICH se logró después de que se desarrolló el método de tinción diferencial de las cromátidas hermanas, que permite identificar los segmentos intercambiados (aun cuando estos sean muy pequeños) a partir de la diferencia de color entre las cromátidas hermanas. Este método se basa en la incorporación de una base análoga, la 5-bromodesoxiuridina (**5-BrdU**) al ADN, en el momento de su replicación. En el primer ciclo de replicación en presencia de la base solo una cromátida ha incorporado 5-BrdU; en el segundo ciclo de replicación se puede apreciar

que las dos cromátidas han intercambiado sus segmentos. Aunque las células en cultivos se desarrollan en un ambiente artificial, y todos los factores que se agregan al desarrollo de la técnica son inductores de ICH, se han podido establecer frecuencias basales, en condiciones normales que, dependiendo de las diferentes células, se han podido determinar con un intervalo de 2-20 ICH por metafase, y frecuencia promedio de 5-8 en linfocitos humanos de sangre periférica.

El ensayo de ICH se puede llevar a cabo teóricamente en cualquier tejido, pero por su fácil acceso se suele recurrir con más frecuencia a la inducción de ICH en cultivo de linfocitos humanos de sangre periférica, en médula ósea *-in vivo-* y en cultivo de fibroblastos *-in vitro-*. Los linfocitos de sangre periférica, como sistema celular de ensayo, presentan una serie de características que los hacen especialmente apropiados para su utilización en esta técnica:

- a. Disponibilidad fácil y en gran número (1 ml de sangre contiene en promedio 2000 linfocitos por ml de sangre).
- b. Crecimiento fácil en cultivo tras ser estimulados con un mitógeno (normalmente fitohemaglutinina). Los linfocitos T son estimulados a entrar en mitosis.
- c. Poseen una amplia distribución en el organismo. Los linfocitos T no están permanentemente circulando, sino que hay una recirculación entre la sangre y los tejidos extravasculares. Esta característica los hace ser apropiados para reflejar los efectos de una exposición en cualquier área del cuerpo.
- d. Los linfocitos circulantes, normalmente, se encuentran en fase de no división (G_0). Al cultivarlos en presencia del mitógeno se estimula la división mitótica, lo que permite el estudio de los cromosomas en metafase.
- e. Los linfocitos tienen una vida media de unos cuatro años, aunque se pueden encontrar linfocitos que pueden sobrevivir durante varias décadas. Esta propiedad es interesante, junto con el hecho de hallarse en fase de no división en el torrente circulatorio, porque permite detectar efectos clastogénicos transcurrido algún tiempo desde la exposición, ya que las lesiones en el ADN persisten. [Morales, 1988; Pérez-Herrera, y cols.1999; Gartner y Hiatt, 2002

3. OBJETIVOS

Objetivo General

Estudiar la inducción de intercambios de cromátidas hermanas (ICH) en cultivo de linfocitos humanos, de un extracto acuoso de corteza de *Amphipterygium adstringens* (Cuachalalate) el cual es su principal forma de uso, para caracterizar su genotoxicidad.

Objetivos Particulares

Determinar la frecuencia de ICH en cultivos de linfocitos humanos expuestos a diferentes concentraciones de un extracto acuoso de corteza de cuachalalate.

Evaluar la cinética de proliferación celular de cultivos de linfocitos humanos expuestos a diferentes concentraciones de un extracto acuoso de corteza de cuachalalate.

4. Hipótesis

Sí la corteza de la planta medicinal denominada Cuachalalate contiene entre sus principios activos alguno o algunos con actividad genotóxica, entonces la frecuencia de intercambios de cromátidas hermanas (ICH) en un cultivo de linfocitos humanos, expuesto a diferentes concentraciones de una infusión de cuachalalate, se incrementará con respecto a la frecuencia basal.

5. Materiales y Métodos

5.1. Material biológico

15 ml de sangre periférica heparinizada

Corteza de cuachalalate en empaque aluminizado marca Shaya Michan

5.2. Material de laboratorio

Tubos de centrifuga con tapa de 15 mL estériles

Jeringas estériles de 1, 3, 5 y 20 mL

Ligadura

Gradilla

Mechero

Pipetas Pasteur

Portaobjetos

Membranas Millipore de 2 μ m

5.3. Equipo

Campana estéril

Estufa de esterilización

Incubadora

Termómetro

Vórtex

Luz ultravioleta

Centrífuga

Refrigerador

Microscopio óptico

5.4. Reactivos

Agua destilada

Heparina

Medio de cultivo RPMI de la marca GIBCO *

Fitohemaglutinina marca GIBCO
Colchicina
KCl 0.75M
Solución fijadora metanol-ácido acético
Buffer de diferenciación
Solución 2XSSC
Agua destilada
Solución de bisbenzimidida de Hoechts 33258
Giemsa
5-Bromodesoxiuridina concentrada.

5.2. Metodología

5.2.1. Preparación de la infusión de la corteza de cuachalalate e identificación de los ácidos masticadienónicos

Se pesaron 1.5gr de corteza seca y pulverizada de cuachalalate y se disolvió en 250 ml de H₂O a temperatura de ebullición. La infusión se dejó enfriar, se filtró y la muestra utilizada para la identificación química se pasó por una membrana millipore de 2µm. En la misma se identificaron los ácidos masticadienónico y 3α-hidroximasticadienónico por el método de Cromatografía micelar electrocinética (electroforesis capilar) a fin de tener la certeza de trabajar con la corteza indicada. La identificación se realizó en el Laboratorio de Química Medicinal de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán a cargo del Dr. Enrique Ángeles Anguiano, con la ayuda del QFB Víctor Hugo Abrego

5.2.2. Cultivo de linfocitos

I. Siembra

1. Se obtuvo una muestra sanguínea proveniente de un individuo del sexo femenino de 30 años de edad; el cual vive sin exposición a agentes genotóxicos conocidos y se adicionaron 10 gotas de sangre a cada tubo estéril, 8 ml de medio de cultivo RPMI y 0.4ml de fitohemaglutinina como mitógeno. Se trabajó cada tubo por duplicado.
2. A continuación se incubaron los tubos a 37 °C por 24 horas.

- 3...Se preparó una infusión de cuachalalate media hora antes de su utilización pesando 1.5 gramos de la corteza seca de cuachalalate y se agregó a 250ml de agua a temperatura de ebullición y se dejó en reposo hasta que la infusión alcanzó la temperatura ambiente, se filtró y a continuación la infusión requerida fue pasada por una membrana de 2µm para su esterilización.
4. A las 24 horas de incubación se agregó a cada tubo 45 µl de 5-BrdU y la infusión de cuachalalate (tratamientos) en las cantidades indicadas de acuerdo a la tabla II y posteriormente se continuó la incubación a 37°C hasta completar las 71 horas.

Tabla II. Adición en microlitos y en g/ml de la infusión de Cuachalalate al 0.6%

Tratamiento	Concentración final: g/ml
Control mitótico: Solo PHA	
Control: BrdU a una conc. de 1mg/ml, 45 µl (por tubo)	
Tratamiento: 10 µl de extracto acuoso de cuachalalate	6×10^{-5}
Tratamiento: 25 µl de extracto acuoso de cuachalalate.	1.5×10^{-4}
Tratamiento: 50 µl de extracto acuoso de cuachalalate	3×10^{-4}
Tratamiento: 100 µl de extracto acuoso de cuachalalate	6×10^{-4}
Tratamiento: 500 µl de extracto acuoso de cuachalalate	3×10^{-3}
Tratamiento: 1000 µl de extracto acuoso de cuachalalate.	6×10^{-3}

II. Cosecha.

1. A las 71 horas de incubación se adicionó a cada tubo 50 µl de solución de trabajo de colchicina –mitostático- y se continuó la incubación por 2 horas a 37°C; a continuación se centrifugaron todos los tubos a 3000 rpm durante 10 minutos, se les retiró el

sobrenadante, se resuspendieron los paquetes celulares y se les adicionaron 10 ml a cada tubo de solución hipotónica de KCl 0.075M y se le dejó en incubación por 20 minutos más a 37°C

2. A continuación se centrifugaron todos los tubos a 3000 rpm durante 5 minutos, se les retiró el sobrenadante y se procedió a fijar el paquete celular con solución fijadora metanol / ácido acético 3:1 durante 10 minutos.
3. Se repitió el paso 2, más de dos veces hasta que se obtuvo un sobrenadante transparente.
4. Después de la última centrifugación, se retiró el sobrenadante dejando una cantidad suficiente, aproximadamente 0.5 ml, con la cual se resuspendió el paquete celular y se realizaron las preparaciones cromosómicas por goteo sobre portaobjetos limpios los cuales se flamearon después del goteo.
5. A las 24 horas de haber realizado las preparaciones cromosómicas, éstas se sometieron a la tinción diferencial de acuerdo al siguiente procedimiento:

Se colocaron 6 gotas de solución de trabajo de Bisbenzimidá Hoescht sobre las laminillas y se expandió colocando un cubreobjetos encima. Las laminillas se colocaron 30 minutos en la oscuridad. Posteriormente se adicionó buffer de diferenciación alrededor del cubreobjetos y se expusieron a la luz negra durante 90 minutos a una distancia de 1cm. Al retirarlas de la luz negra, se sumergieron en agua destilada para enjuagar y retirar el cubreobjetos, después se sumergieron en solución 2XSSC por 15 minutos a 60°C y posteriormente se enjuagaron primero en agua caliente y luego en agua fría. Se dejaron secar al aire y después se tiñeron con Giemsa.

6. Lectura de las preparaciones cromosómicas

Se realizaron las lecturas que a continuación se enumeran:

- Se contó el número de células en metafase que se encontraban en 1ª, 2ª y 3ª división celular, contenidas en 100 células del cultivo celular, para cada tratamiento así como para el control de BrdU –control negativo-, contra el cuál se contrastó el crecimiento celular de los tratamientos y así, determinar la cinética de proliferación celular (CPC).

Se utilizó la misma lectura para calcular el índice de replicación (IR).

- Se contaron el número de células en metafase de 1ª, 2ª de 3ª división celular contenidas en 1000 células del cultivo celular para cada tratamiento incluyendo el control de 5-BrdU se calculó el Índice mitótico (IM).
- Se contó el número de ICH en 25 células en metafase de 2ª división. La lectura se realizó sólo en células con una dotación cromosómica completa; es decir 46 cromosomas.
- Se realizó el análisis estadístico de datos; ANOVA para el conteo de ICH y de regresión para la CPC y el IM.

Fórmulas.

$$\%IM = \frac{\text{No. metafases}}{1000 \text{ células}} \times 100$$

$$IR = \frac{(\text{no. de Metaf. De } 1^{\text{a}}) + 2(\text{no. de Metaf. de } 2^{\text{a}}) + 3(\text{no. de Metaf. de } 3^{\text{a}})}{100}$$

6. Resultados

Tabla III. Cinética de proliferación celular, índice de replicación e índice mitótico.

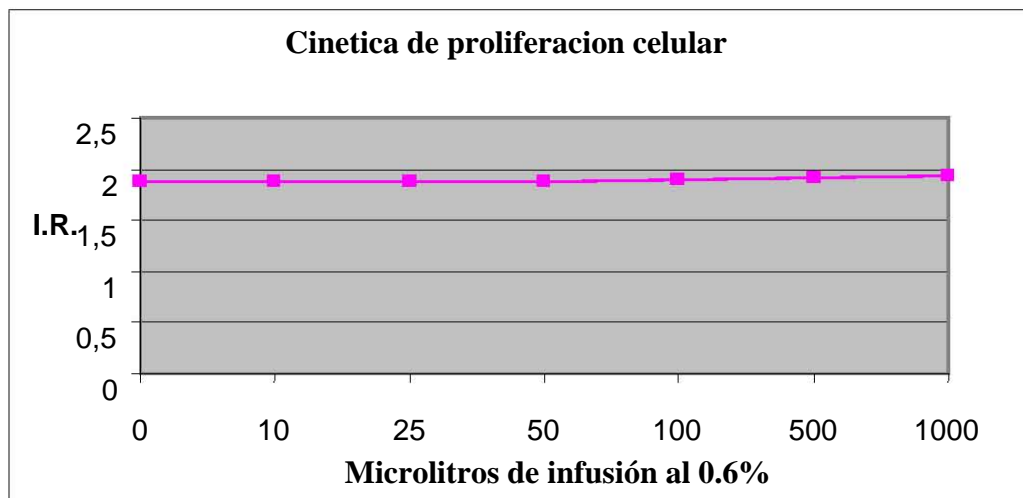
Tratamiento	Cinética de proliferación celular					Índice mitótico
	No. de células	Metafases en 1ª div.	Metafases en 2ª div.	Metafases en 3ª div.	Índice de Replicación	$\frac{\text{No. de metafases}}{1000 \text{ células}} \times 100$
PHA	100					2.8
BrdU	100	50	35	15	1.65	1.3
10	100	38	36	26	1.88	1.0
25	100	23	39	38	2.15	1.1
50	100	29	40	31	2.02	1.2
100	100	45	39	16	1.71	1.5
500	100	43	24	33	1.9	1.0
1000	100	41	24	35	1.94	1.0

Tabla IV. Frecuencia de Intercambios de cromátidas hermanas.

Tratamiento	No. de células en metafase de 2ª div.	Intercambios de cromátidas hermanas		
		Intervalo	Media	\pm D.S.
BrdU	25	0-6	3.2	1.5
10	25	0-8	3.4	2.3
25	25	0-10	3.5	2.5
50	25	0-9	3.2	2.3
100	25	1-7	4.0	1.5
500	25	0-9	4.5	2.4
1000	25	0-12	4.6	3.1

Tabla V. Resultados del análisis de varianza para las frecuencias de ICH de los cultivos expuestos a diferentes concentraciones de la infusión de cuachalalate.

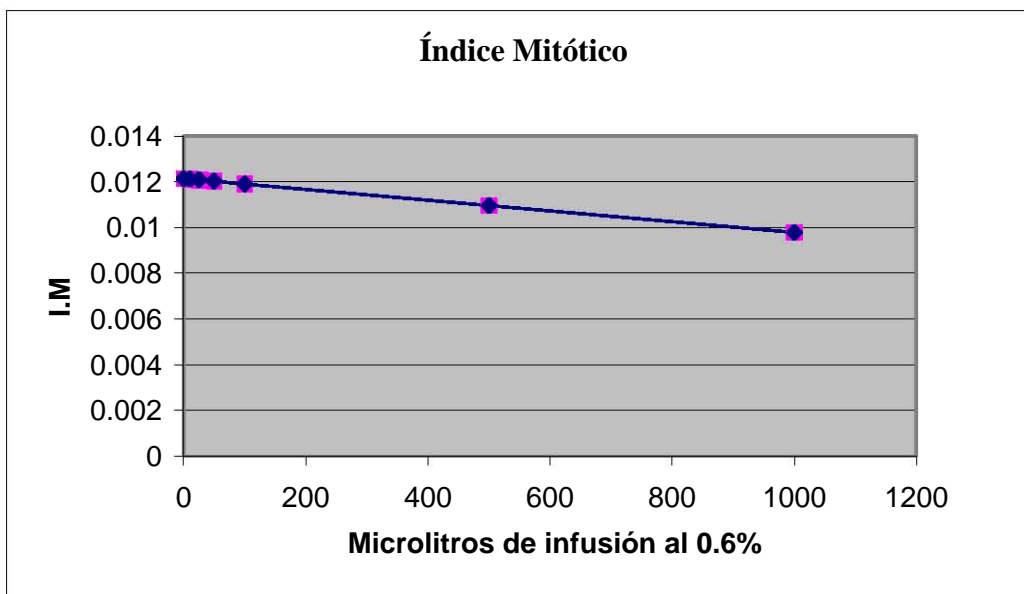
Fuente	g.l.	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F	P	Fcr.
Entre muestras	6	53.154	8.859	1.639	0.1394	2.153
Dentro de las muestras	168	908.24	5.406			
Total	174	961.39				



Gráfica 1. Cinética de proliferación celular de los cultivos de linfocitos sometidos a las diferentes dosis de la infusión de cuachalalate y su efecto en el I.R.

$$y = -0.0000525X + 1.88$$

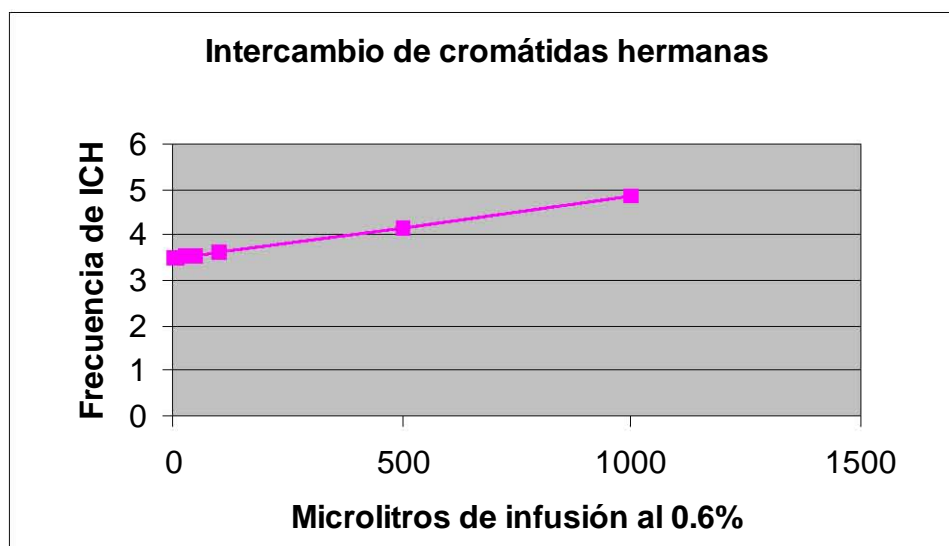
$$r^2 = 0.01338 \quad \alpha = 0.0$$



Gráfica 2. Índice mitótico de los cultivos de linfocitos sometidos a las diferentes dosis de la infusión de cuachalalate.

$$y = -0.00000235X + 0.12$$

$$r^2 = 0.2197, \alpha = 0.05$$



Gráfica 3. Frecuencia de intercambio de cromátidas hermanas de los cultivos de linfocitos sometidos a las diferentes dosis de la infusión de cuachalalate.

$$y = 2.36X + 3.34$$

$$r^2 = 0.7866, \alpha = 0.05$$

- Las CPC (tabla III, gráfica 1) para éste ensayo muestran que todos los índices de replicación para los cultivos celulares de este ensayo fueron mayores con respecto al control negativo, sin embargo estos incrementos no fueron estadísticamente significativos ($\alpha= 0.05$), y en consecuencia no existe una correlación entre la dosis de la infusión aplicada en los cultivos y el efecto o I.R; así mismo, no se observó acumulación de metafases de 1ª división en los cultivos en ninguna de las dosis de la infusión, lo que implica que los ciclos celulares transcurrieron de forma rítmica y constante.

- Los IM (tabla III, gráfica 2) para este ensayo, no muestran diferencias estadísticamente significativas ($\alpha= 0.05$) con respecto al control negativo, indicando que no hay correlación entre la dosis de la infusión aplicada y la capacidad celular de división para originar dos células hijas.

- La frecuencia de ICH estudiada en tablas (tabla IV y V, gráfica 3), mostró que no existe diferencia significativa entre las medias $\mu_0 = \mu_{10} = \mu_{25} = \mu_{50} = \mu_{100} = \mu_{500} = \mu_{1000}$ para los diferentes tratamientos y en consecuencia; que los resultados de los conteos de ICH obtenidos para las diferentes dosis de la infusión aplicada a los cultivos, son homogéneos; de estos resultados podemos inferir que al no rebasar de forma significativa el número de ICH obtenido en los diferentes tratamientos, con respecto al número de ICH del control negativo; la infusión de Cuachalalate no presenta efecto de inducción de ICH sobre los cultivos de linfocitos.

7. Discusión

En este trabajo se utilizó una infusión de cuachalalate preparada al 0.6%, la cual se fue adicionando en diferentes cantidades que comprendieron un rango amplio: de 10, 25, 50, 100, 500 y 1000 μ l, con una concentración equivalente a 6×10^{-5} , 1.5×10^{-4} , 3×10^{-4} , 6×10^{-4} , 3×10^{-3} , 6×10^{-3} g/ml. Estas concentraciones fueron consideradas una vez que probaron que permitían la proliferación celular adecuada para realizar las lecturas de ICH; ya que debido a la cantidad y concentración no determinadas de algunos de los componentes presentes en la infusión de cuachalalate; así como al desconocimiento de la forma de actuar del conjunto de ellos con las células expuestas o linfocitos; se observaron algunas interferencias en los cultivos como fueron: turbidez del sobrenadante, coloración ambarina propia de la infusión que impregnó los paquetes celulares, los cuales además se fueron haciendo más voluminosos a medida que se incrementaban la concentración de principios activos adicionados, debido quizás a la interacción de los compuestos tánicos con las proteínas presentes en la matriz sanguínea como son la albúmina, globulinas, fibrinógeno, factores de coagulación, enzimas; así como en las membranas celulares o plasmáticas y quizás también con proteínas intracelulares. (Del Fresno, 1999; Kuklinski, 2000; Santana y cols. 2002). Estas interferencias no permitieron en un principio la proliferación celular de los cultivos y hubo que considerarlas para continuar con el trabajo ya que, el incremento en la densidad celular no era indicativo de una gran proliferación celular y quizás estas mismas interferencias brindaron a las células sanguíneas una resistencia no prevista ya que a medida que las dosis de cuachalalate fueron en aumento, la labilidad de las membranas contra el proceso de fijación del método que se realizó durante la cosecha fue en decremento y las membranas plasmáticas, aparecieron más tarde en las preparaciones cromosómicas.

Una vez que estas interferencias fueron salvadas, a las concentraciones trabajadas se observó que la cinética de proliferación celular (CPC) no sufrió retraso como se observa en la tabla III, gráfica 1 y aunque los índices de replicación (IR) se observaron incrementos, éstos no fueron estadísticamente significativos con respecto al control negativo en todos los tratamientos, estos no fueron uniformes y por lo tanto indicativos de que pudiera existir una relación lineal entre las concentraciones adicionadas de la infusión y el IR; pero sí se

observó que con adiciones de la infusión mayores a la concentración 6×10^{-3} g/ml producían una caída en la proliferación de los linfocitos tratándose tal vez de un efecto citotóxico excesivo [Calzada, 1989; Martínez y Flores, 2002; Domínguez 2005; Rea y cols. 2003; Oviedo y cols. 2005] y aunque se desconoce cual es la acción del conjunto de los componentes, la inhibición de la proliferación celular podría deberse también en primer lugar a la presencia de los compuestos tánicos, los cuales al formar complejos con las proteínas de las membranas celulares así como las contenidas en el plasma, pudieron haber limitado el espacio físico de la célula, inhibiendo el inicio del ciclo celular en la fase G1 que es el momento en que la célula debe aumentar su volumen debido a la gran actividad metabólica requerida para la producción de los componentes necesarios para la generación de dos células al final del ciclo. De igual manera el resto de los componentes podrían estar contribuyendo con el efecto citotóxico, ya que algunos de ellos en estudios de caracterización y evaluación de su actividad biológica como son los ácidos masticadienónico, 3α -hidroximasticadienólico, $24,25S$ -dihydromasticadienónico y el masticadienólico; inhibieron el crecimiento de 5 líneas celulares de cáncer de colon humano [Oviedo y cols. 2005]; otros estudios son los de citotoxicidad de los alquilfenoles de cadena larga de Calzada (1989), el de Domínguez (2005) y los de citotoxicidad observado en el extracto hexánico de cuachalalate de Martínez y Flores (2002).

En relación a los resultados correspondientes al índice mitótico, como se puede apreciar en tabla III, gráfica 2; los resultados son homogéneos en todos los tratamientos y estos no mostraron una diferencia estadísticamente significativos con respecto al control negativo, al respecto se puede decir, que no obstante el desconocimiento de la acción biológica del conjunto de los principios activos del cuachalalate, éstos no parecen haber dañado al genoma puesto que una vez que las células fueron estimulas a proliferar en presencia los diferentes compuestos del cuachalalate, las fases del ciclo celular continuaron hasta llegar a la división celular o mitosis y es factible que sí los linfocitos de los cultivos estuvieron sometidos en algún momento durante los tratamientos a un efecto citotóxico de algunos compuestos de cuachalalate [Martínez y Flores, 2002; Domínguez, 2005, Oviedo y cols. 2005], los efectos individuales benéficos para las células como son los efectos antioxidantes y los inhibitorios de la peroxidación lipídica [Del Fresno, 1999;

Kuklinski, 2000; Santana y cols. 2002] provenientes de los polifenoles presentes en la infusión participaron contrarrestando la citotoxicidad.

En cuanto a los resultados de frecuencia de intercambios de cromátidas hermanas estudiadas en este trabajo, como se puede apreciar en la tabla IV y gráfica 3; las frecuencias en los diferentes tratamientos parecen tener una dispersión considerable con respecto al control negativo; el análisis estadístico muestra que existe homogeneidad entre los grupos y que las diferencias no son significativas; con un coeficiente de correlación de $r^2 = 0.7866$. Dada la gran sensibilidad de la prueba de inducción de ICHs, y a que en este trabajo se evaluó el efecto biológico resultado de la confluencia de varios principios activos en la infusión, los resultados no mostraron que la infusión de cuahalalate indujera formación de ICHs provocando un daño genotóxico. Por otro lado, se sabe que los polímeros fenólicos tienen la propiedad de formar complejos con diferentes macromoléculas entre ellas el ADN [Del Fresno, 1999; Kuklinski, 2000], y quizás esta interacción le brinde al ADN estabilidad y protección contra el ataque electrofílico de los radicales libres ya que los polifenoles también poseen propiedades antioxidantes, limitando los rompimientos en la cadena de ADN [Del Fresno, 1999, Kuklinski, 2000, Santana y cols. 2002].

8. Conclusiones

1. La adición de la infusión de cuachalalate a las concentraciones trabajadas en los cultivos de linfocitos, no retrasó significativamente la cinética de proliferación celular y por lo tanto, los principios activos presentes del cuachalalate, ejerciendo su acción en conjunto, no son citotóxicos.
2. La infusión de cuachalalate no resultó genotóxica, ya que la frecuencia de Intercambio de Cromátidas Hermanas, que evalúan la acción “S dependiente” de los mutágenos, no se incrementaron en ninguna de las concentraciones trabajadas en los tratamientos.

9. Bibliografía

Aguirre, Ma. Teresa. (1983). “Estudio farmacológico del efecto antiulcerogástrico de una fracción pura de la planta *Juliania adstringens*”. Tesis profesional. ENEP- Iztacala. UNAM

Almaguer, J. y García, R. (2003). “Relación intercultural con la medicina tradicional”. Dirección de medicina tradicional y desarrollo intercultural. Secretaría de salud.

Arroyo, G. (1994). “Estudio de las propiedades fotoprotectoras –cosméticas del extracto de *Juliania adstringens* (cuachalalate)”. Tesis profesional. FES- Cuautitlán. UNAM

Benítez, J. (1998). “Evaluación farmacológica del efecto gastroprotector de los triterpenoides de la corteza de cuachalalate (*Juliania adstringens*) en rata Wistar”. Tesis profesional. FES-Zaragoza. UNAM.

Brewster, R.Q., VanderWerf C. A., McEwen, W. E. (1982). Curso Práctico de Química Orgánica. 2ª edición. Ed. Alambra. España.

Bruneton, J. (2001). Farmacognosia. 2ª edición. Ed. Acribia. España.

Calzada F. (1989). “Meltilenquinonas triterpénicas y alcaloides sesquiterpénicos de *Hippocratea excelsa* H.B.K. y alquilfenoles de *Amphipterygium adstringens* Schiede ex Schlecht”. Tesis de Maestría. Facultad de Química. UNAM.

Cañigual, S. y Vanaclacha, B.(2000). Fitoterapia, Vademécum de prescripción. 4ª. Editorial. MASSON.

Casillas, J. A. (1999). “Investigan nuevos inmunomoduladores vegetales” Gaceta Universitaria de la Universidad Autónoma de Guadalajara.

Chiereghin, P. (2000). Farmacia Verde. AMV Ediciones/MundiPrensa. Madrid.

Das, B.C., (1988). Factors that influence formation of sister chromatid exchanges in human blood lymphocytes. CRS. Crit. Rev. Toxicol 19:43-48

Därr, A. (Comp.) (1979). Tecnología farmacéutica. 4ª edición. Editorial Acribia. Zaragoza España.

Del Río, E. (1975). El yerberito ilustrado. 21ª ed. Editorial Posada. México.

Del Fresno, A. M. (editor) (1999). Farmacognosia General. Ed. Síntesis. España.

Domínguez, X., Franco, R., García, S. (1981). Estructura del ácido instipolinácico separado de la corteza de cuachalalate (*Amphipterygium adstringens*) Schl.”. Plantas medicinales mexicanas XLVIII: *Rev. Latinoamer. Quím* 14(2), 99-100.

Domínguez, Maritere (2005). “Actividad genotóxica del ácido 6-nonadecilsalicílico aislado

de la corteza de cuachalalate y de su este metílico evaluada en sangre periférica de ratones CD1 con la prueba de micronúcleos”. Tesis profesional. FES Cuautitlán. UNAM.

Fernández, Jenny. (2003). “Valoración del efecto cicatrizante del cuachalalate (*Amphipterygium adstringens*). Tesis profesional. FES- Zaragoza. UNAM.,

Gartner, Leslie y Hiatt, J. (2002). Atlas de Histología. Ed. McGraw-Hill. Columbia.

González, E., Edward, E., Delgado, J. (1962a). “Phytochemical Investigation of *Amphipterygium adstringens*.” Journal Pharmaceutical Sciences. 51(8), 786-790.

González, E., Mckenna, G., Delgado, J. (1962b). “Anticancer evaluation of *Amphipterygium adstringens*”. Journal Pharmaceutical Sciences. 51(9), 901-903.

González, M. (2004). Herbolaria Clínica.VI Congreso Regional de Químicos Farmacéuticos Biólogos. [CD-ROM]. Biblioteca Universitaria Raúl Rangel Frías

Kuklinski, Claudia. (2000). Farmacognosia. Ed. Omega. Barcelona.

Kumate, J. (1990). “Libellus de medicinalibus indorum herbis”. Ciencia y desarrollo. 15(95):17-22.

Lozoya, X. (1998). La herbolaria en México. Editorial Tercer Milenio-CONACULTA México.

Martínez, Eréndira y Flores, Guadalupe.(2002). “Estudio de la acción anticlastogénica del cuachalalate (*Amphipterygium adstringens*) sobre la inducción de micronucleos producidos por ifosfamida”. Tesis profesional. FES Cuautitlán-UNAM.

Martínez, M. (1996). Las plantas medicinales de México. 6ª ed. Editorial Botas, México.

Martínez, Leonor Sara (1994). “Evaluación de la acción citoprotectora del extracto metanólico de *Amphipterygium adstringens* sobre úlcera gástrica”. Tesis profesional. FES-Zaragoza. UNAM.

Martínez-Vizcarra. (1986). “Estudio químico y determinación de las acciones hipoglucemiante y cicatrizante del cuachalalate (*Juliania adstringens*)”. Tesis profesional. Universidad Autónoma de Guadalajara. Citada por Zamudio, (2005).

Masatsune Murata, Junko Irie †, Seiichi Honma. (1997). “Inhibition of lipid Synthesis of bacteria, yeast and animal cells by anacardic acids, glycerol-3-phosphate deshidrogenase inhibitors from Ginkgo”.Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie. 30(5):458-463.

Mitsuko Makino, Tomohiro Motegi, Yasuo Fujimoto. (2003). “Tirucallene-type triterpenes from *Juliania adstringens*”. Phytochemistry. 65(7), 891-896.

Morales, P. (1988). “El daño a la información genética y los intercambios entre cromátidas hermanas”. Ciencia y desarrollo. Vol. XIV 81: 65-72.

Navarrete, A. (1982). “Estudio químico y pruebas farmacológicas preliminares de la corteza de *Juliana adstringens* (cuachalalate)”. Tesis profesional. FES Zaragoza. UNAM.

Navarrete, A. (1986). “Estudio químico de las plantas medicinales usadas en medicina tradicional; Constituyentes de *Chenopodium graveolens* Willd, *Chenopodium ambrosiosdes* L y *Amphipterygium adstringens* Schiede ex. Schlecht”. Tesis de Maestría en Ciencias Químicas. Facultad de Química. UNAM

Navarrete, A., Mata, Rachel, Delgado, G.(1989). “Alkylacardic acids for *Amphipterygium adstringens*”. *Planta Médica*. 55:579.

Navarrete, A. (2001). “Valorar la herbolaria a través de la ciencia”. Galería. Los lunes en la ciencia. Diario La jornada.

Noriyoshi Masuoka e Isao Kubo (2004). “Characterization of xantine oxidase inhibition by anacardic acids”. *Biochimica et Biophysica Acta* 1688:245-249.

OMS. Guías para el asesoramiento y la regulación de las medicinas tradicionales. (1992). Ginebra:

OPS, (1999). *Sistemas de Salud Tradicionales en América Latina y el Caribe: Información de Base*, Washington, D.C.

Oviedo, I., Apan, T., Martínez-Vázquez, M. (2005a). “Cytotoxic Activity an effect on nitric oxide production of tirucallane-type triterpenes”. *Journal of pharmacy and pharmacology* 57(9): 1087-1091

Oviedo-Chávez, T., Ramírez-Apan, M., Soto-Hernández, M., Martínez-Vázquez, M. (2004b). “Principles of the bark of *Amphyterigium adstringens* (Julianaceae) with anti-inflammatory activity”. *Phytomedicine* 11(436-445).

Olumayokun A. Olajide, Mutallib A. Aderogba, Aduragdendro D. A. Adedapo, Janet M. Makinde. (2004). “Effects of *Anacardium occidentale* stem bark extract on in vivo inflammatory models”. *Journal of Ethnopharmacology*. 95:139-142

Pahlow, M.(1979). *El gran libro de las plantas medicinales*. Ed. Everest Mexicana. México.

Pérez-Herrera, Norma, Cevallos-Quintal, José M., Pinto-Escalante, Doris. (1999). “Prevalencia de intercambio de cromátidas hermanas en una población libre de agentes clastógenos”. *Revista Biomédica* 10:71-76.

Pérez, R., Pérez, C., Pérez, M., (1993) “A new triterpenoid from the bark of *Juliania adstringens*”. *International Journal of Pharmacognosy*. 31(39), 185-188.

Plantas Medicinales (Naturismo). (1996). Editorial Mexicanos Unidos 6° reimpresión. México.

Quintanar, Maritza (2005). "Inducción de intercambios de cromátidas hermanas y modificación de la cinética de proliferación celular provocada por el extracto hexánico de cuachalalate en cultivo de linfocitos humanos". Tesis profesional. FES-Cuautitlán. UNAM

Rea, Ángela., Schmidt, Jennifer., Setzer W., Samson Sibanda., Taylor, Catherine, Gwebu E. (2003). "Cytotoxic activity of *Ozoroa insignis* from Zimbabwe". *Fitoterapia* 74:732-35

Rivero-Cruz, Isabel; Acevedo, Laura., Guerrero, José A.; Martínez, S.; Bye, R.; Pereda-Miranda R.; Franzblau, S.; Timmermann, Bárbara N.; Mata, Rachel. (2005). "Antimycobacterial agents from selected Mexican medicinal plants". *Journal of Pharmacy and pharmacology*. 57(9), 1117-1126;

Rodríguez Rosario, (1994). Las toxinas ambientales y sus efectos genéticos. Colecc. La Ciencia para todos. 3ª edición. SEP, FCE, CONACYT. México.

Rojas, M.(2001). Las plantas medicinales de México. *Tlahui-Medic*. No.11
<http://www.tlahui.com/med/med11/cuach/1.htm>

Romero, O., Reyes, H., Torres, I., Torija, A., Herrera, J. T. (2005). "Conocimiento sobre fitofármacos en médicos de atención primaria del estado de Morelos". *Rev Med IMSS*, 43(4): 281-286

Romo, A. (1998). Importancia de las Plantas en la vida del hombre: usos mágicos y medicinales. Química, Universo, Tierra y Vida. Colecc. La ciencia para todos. 5ª reimpresión. Fondo de Cultura Económica, México.
<http://bibliotecadigital.ilce.edu.mx/sites/ciencia/volumen1/ciencia2/51/htm/química.htm>

Rosas, A. (2005). Estudio químico y biológico de la corteza de *Amphipterygium adstringens* Schiede ex Schlech. Tesis grado Doctorado. Colegio de Postgraduados.1

Santana, J., Fabián, C., Martínez, F., Pérez, R., Montalva, M., Ávila A. Ma., Codorniú E. (2002). "Biodistribución y farmacocinética de taninos de *Pinus caribaea* Morelet y *Cuasuarina equisetifolia* en ratones". *Rev Cubana Farm*. 36(2):112-20.

Silva, M. (1990). "Evaluación de la actividad biológica de *Amphipterygium adstringens* Schiede ex Schelch en la úlcera péptica inducida experimentalmente en rata". Tesis profesional. FES-Zaragoza. UNAM, pp. 23-24.

SIRE-Paquetes Tecnológicos. *Amphipterygium adstringens*. CONABIO. México.(2005)
http://www.gob.mx/institución/conabio_espanol/datosperfil.htm.

Soriano, M., Toscano, R., Ortiz, B., Navarrete, A., Sánchez, O., Barrios, H., Yuste, F. (1987). "Structure and stereochemistry of the methyl ester of (5 α , 13 α , 14 β , 17 α , 20S, 24Z)3-oxolanosta-7, 24-dien-26-oic acid(masticadienonic acid)". *Acta Crystallographica*. C34:990-992.

Valdez, R., Aguilar Abigail., López, Ma. Edith. y Xalalpa, S. (2002). *Herbolaria mexicana. México desconocido-CONACULTA*. México.

Viesca, C. (1993). “La herbolaria medicinal en México prehispánico”. *La investigación científica de la herbolaria medicinal*. Secretaria de Salud. México.

Watson, G., Domínguez, J., Vázquez, G., García, S. (1987). “Cuachalalic acid, a new triterpene from *Amphyterigium adstringens*”. *Revista Latinoamericana de Química*. 18(3) 89-90.

Yerbario Medicinal de México. (1986). 8° edición. Editorial Mexicanos Unidos. México.

Zacarías, Magali del Rosario (1993). “Efectos preliminares del efecto funguicida del cuachalalate (*Juliania adstringens*) y de la cancerina (*Himiangium excelsum*)”. Tesis profesional. Facultad de Ciencias. UNAM.

Zamudio, Luz Angélica (2005). “Estudio Hemero-bibliográfico del cuachalalate (*Amphipterygium adstringens*) en forma de fitofármaco”. Tesis profesional. FES Cuautitlán. UNAM.

<http://www.plantasmedicinales.org>

www.mexicodesconocido.com.mx/espanol/naturaleza/flora/detalle.cfm?idcat=2&idsec=10&idsub=29&idpug=723#