



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA

Evaluación de las Actividades Genotóxicas y Citotóxicas
in vivo del Extracto Acuoso y del
7-O- β -D-glucopiranosido de la acetina, obtenidos de
Agastache mexicana subsp *mexicana*

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

P R E S E N T A:

ARIAN VIRIDIANA MARTÍNEZ GALICIA



DIRECTOR DE TESIS:
DR. MARIANO MARTÍNEZ VÁZQUEZ

ASESOR:
DR. ARTURO EDUARDO CANO FLORES

CIUDAD DE MÉXICO, MAYO DE 2018



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio 1-4 del Departamento de Productos Naturales del Instituto de Química y en el Departamento de Citogenética Humana del Centro de Ciencias de la Atmosfera.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México.

A la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza.

Al Dr. Mariano Martínez Vázquez, por su valioso apoyo en la elaboración y supervisión de este trabajo.

A la Dra. María Elena Calderón Segura, por su colaboración y asesoría en la preparación de las pruebas biológicas.

A la M. en C. Marcela Mejía Flores, por su ayuda en la elaboración de las pruebas biológicas.

A los sinodales: QFB Enriqueta Castrejón Rodríguez, Dr. Arturo Eduardo Cano Flores, M. en F. Leticia Huerta Flores y Dra. Juana Rosado Pérez, por sus consejos y observaciones.

Al Personal Técnico del Instituto de Química.

DEDICATORIAS

A mí mamá, gracias por apoyarme siempre, gracias a ti se lo que es el esfuerzo para conseguir lo que uno quiere y que no hay imposibles, eres el mejor modelo de lo que una mujer puede llegar a ser, gracias por todo, gracias por creer siempre en mí.

A mí papá, gracias por darme las herramientas para salir adelante, por hacerme fuerte, por enseñarme la responsabilidad y perseverancia, te amo. Este logro es para ustedes.

A Ian, para ti por ser la luz de mi vida, lo más perfecto que existe, la razón de mi ser, gracias por ser mi inspiración y el motivo de todo lo mejor que puedo ser.

A Etienne, mi primer amor, el hombre que quiero a mi lado, gracias por apoyarme incondicionalmente y por tus palabras de aliento cuando más lo necesitaba.

A mis hermanos Oscar y Claudia, mis compañeros de vida inseparables e incondicionales.

A José Luis (mi niño hermoso) eres un ángel que cambió mi vida.

A Mamátola, el pilar de una gran familia.

A mi abuela Jovita Luna[†].

A Elíde, mi hermana, gracias por estar conmigo desde hace más de 15 años y hacerme reír tanto, por estar en mis buenos y malos momentos y cuando más te he necesitado, siempre estaremos juntas.

A Lucía y Daniela por formar parte de mi vida.

A Adry Hdz. y Karí por ser las mejores amigas que he conocido.

A mis amigos Griselda, Pavel, Marce, Adry Mtz, Clarisa, Lorena, Roberto, Wendy, Karlita, Emmanuel, Rodolfo y Agustín.

A Nadia Ortega, Araceli Guerra y Pepe Contreras.

A la Sra. Ma. Victoria Pérez por ayudarme tanto.

ÍNDICE

RESUMEN	1
I. INTRODUCCIÓN	2
II. MARCO TEÓRICO	4
2.1 Descripción de la especie <i>Agastache mexicana</i> subsp <i>mexicana</i>	4
2.2 Usos Etnobotánicos del Toronjil Morado	5
2.3 Composición Química	5
2.4 Flavonoides con Actividad Biológica	9
2.5 Actividad biológica del 7-O- β -D-glucopiranosido de la acacetina (Tilianina)	10
2.6 Genotoxicidad	11
2.7 Electroforesis Unicelular Alcalina (Ensayo Cometa)	12
2.8 Ensayo con Micronúcleos	14
2.9 Viabilidad Celular	16
III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	18
IV. HIPÓTESIS	19
V. OBJETIVOS	20
5.1 Objetivo General	20
5.2 Objetivos Particulares	20
VI. MATERIAL Y MÉTODOS	21

6.1	Diseño (Tipo de Estudio)	21
6.2	Universo (Población o Muestra)	21
6.3	Variables	21
6.3.1	Variables Independientes	21
6.3.2	Variables Dependientes	21
6.4	Materiales	22
6.5	Reactivos	22
6.6	Equipos	23
6.7	Diagrama de Flujo del Estudio Químico	25
6.7.1	Estudio Químico	26
6.7.2	Colecta del Material Vegetal	26
6.7.3	Obtención del Extracto Acuoso	26
6.7.4	Obtención del Extracto de Metanol	27
6.7.5	Aislamiento e Identificación del (2-acetil)-7-O- β -D-glucopiranosido de la acacetina y del 7-O- β -D-glucopiranosido de la acacetina (Tilianina)	27
6.8	Diagrama de Flujo del Estudio Biológico	30
6.8.1	Estudio Biológico	31
6.8.2	Animales y Dosificación	31
6.8.3	Ensayo Cometa Alcalino	34
6.8.4	Ensayo con Micronúcleos	35
6.8.5	Viabilidad Celular	37

VII. ANÁLISIS Y RESULTADOS	38
7.1 Estudio Químico	38
7.1.1 Obtención de extractos y aislamiento de los glucósidos de flavonoide	38
7.1.2 Elucidación Estructural de la Tilianina	39
7.1.3 Elucidación Estructural del (2-acetil)-7-O-β-D-glucopiranosido de la acetina	41
7.1.4 Análisis por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (CLAR)	43
7.2 Estudio Biológico	44
7.2.1 Evaluación Genotóxica del Extracto Acuoso Mediante el Ensayo con Micronucleos	44
7.2.2 Evaluación Genotóxica del Extracto Acuoso Mediante el Ensayo Cometa	45
7.2.3 Evaluación Genotóxica de la Tilianina Mediante el Ensayo con Micronucleos	49
7.2.4 Evaluación Genotóxica de la Tilianina Mediante el Ensayo Cometa	50
7.2.5 Viabilidad Celular del Extracto Acuoso	54
7.2.6 Viabilidad Celular de la Tilianina	55
VIII. CONCLUSIONES	58
IX. BIBLIOGRAFÍA	60
X. LISTA DE ABREVIATURAS	66
XI. ÍNDICE DE FIGURAS	68
XII. ÍNDICE DE CUADROS	70
XIII. ANEXO	72

RESUMEN

Antecedentes: La infusión de *Agastache mexicana* subsp *mexicana* conocida como toronjil morado, es recomendada en la medicina herbolaria para el tratamiento de la ansiedad. Estudios químicos han evidenciado que los glicósidos de flavonas son los principios activos del toronjil y que tienen acción sobre el sistema nervioso central. El intenso uso de esta especie en la medicina tradicional, en adición a su alta actividad biológica, hace necesario realizar la determinación de su actividad citotóxica y genotóxica, de ahí la importancia del presente trabajo.

Objetivo: Realizar las evaluaciones genotóxicas y citotóxicas del extracto acuoso y del 7-O- β -D-glucopiranosido de la acacetina (tilianina) obtenidos de la especie *A. mexicana* subsp *mexicana* en sangre periférica de ratones CD1 mediante el ensayo cometa alcalino y micronúcleos.

Método: Se realizó el aislamiento de los metabolitos secundarios a partir del extracto metanólico y la obtención del extracto acuoso liofilizado. Para el ensayo cometa se tomaron muestras de sangre periférica de la cola de ratón CD1 a los que se inyectaron por vía intraperitoneal (IP) 100, 200 y 1000 mg/Kg del extracto acuoso, ciclofosfamida 40 mg/Kg (como testigo positivo) y 20, 80 y 320 mg/Kg de tilianina. Las muestras se tomaron a las 0, 24, 48 y 72 h. Posteriormente se determinó la frecuencia de células con daño al ADN en 100 células. Para el ensayo con micronúcleos se cuantificó la frecuencia de eritrocitos policromáticos micronucleados (EPC-MN) en 1000 eritrocitos policromáticos (EPC). La viabilidad celular se determinó con la técnica de exclusión con azul de tripano.

Resultados: La evaluación genotóxica mediante el ensayo cometa alcalino *in vivo* del extracto acuoso así como de la tilianina indican que ambos son genotóxicos al inducir daño al ADN; sin embargo, los resultados en el ensayo con micronúcleos indican que el extracto acuoso y la tilianina no causan daño a nivel cromosómico a las dosis evaluadas.

Conclusión: Con base en los resultados obtenidos podemos decir que el ensayo cometa alcalino de la tilianina y del extracto acuoso indican un incremento del efecto genotóxico dependiente de la dosis, sin embargo el ensayo con micronúcleos indica que no hay un daño al no haber un incremento estadísticamente significativo en la cantidad de EPC-MN, los resultados nos hacen suponer que existe un mecanismo de reparación de daño oxidativo en el ADN por lo tanto el daño es reversible.

I. INTRODUCCIÓN

En México, el uso de las llamadas plantas medicinales forma parte esencial de las estrategias generadas por la sociedad para la procuración de la salud. La importancia de estas especies vegetales se refleja en el hecho de que son usadas por un gran segmento de la sociedad, no solo en el medio rural sino también en zonas urbanas y semiurbanas. Esta práctica se remonta desde tiempos prehispánicos, y es resultado tanto de la considerable diversidad biológica del país, así como de la composición pluriétnica de su población y de la necesidad de recursos accesibles frente a muy diversos padecimientos.

La infusión preparada con las especies *Agastache mexicana* subsp *mexicana* (toronjil morado), *A. mexicana* subsp *xolocotziana* (toronjil blanco) y *Dracocephalum moldavica* (toronjil azul) es conocida como remedio de los tres toronjiles y se recomienda ampliamente en la medicina herbolaria, para el tratamiento de la ansiedad.

Tomando en cuenta lo anterior nuestro grupo de trabajo, realizó el estudio fitoquímico de los toronjiles morado y blanco. Los resultados indicaron que estas especies diferían en la composición química de sus componentes liposolubles. Sin embargo, mostraron una gran similitud en sus componentes polares predominando varios derivados glicósidicos de la 5,7,4'-trihidroxi flavona.

Estudios previos de nuestro grupo de investigación han demostrado que algunas flavonas inciden sobre receptores GABA, explicando de esta manera la posible acción de los toronjiles en el sistema nervioso central.

En particular, los resultados demostraron que la especie *Agastache mexicana* subsp *mexicana* biosintetiza principalmente flavonoides del tipo acacetina, salvigenina y derivados de la glucosil acacetina, como la tilianina (7-O- β -D-glucopiranosido de la acacetina) y pilosina.

Los resultados de nuestras evaluaciones biológicas indicaron que la tilianina posee propiedades antiinflamatorias en el modelo de edema inducido por TPA en la oreja del ratón. Se conoce que este tipo de flavonoides no solo presentan actividad analgésica, antiinflamatoria, sino que también son activas en el sistema nervioso central. No obstante, a pesar del uso frecuente de esta especie, las actividades genotóxica y citotóxica tanto del extracto acuoso así como de los metabolitos secundarios del toronjil morado no han sido evaluadas. Tomando en cuenta lo anterior se decidió evaluar las propiedades genotóxica y citotóxica del extracto acuoso de *A. mexicana* subsp *mexicana* así como de la tilianina su principal metabolito secundario.

II. MARCO TEORICO

2.1 Descripción de la especie *Agastache mexicana* subsp *mexicana*

El género *Agastache* (Lamiaceae) se constituye por alrededor de 20 especies distribuidas en Asia y Norte América, de las cuales 12 son endémicas de México. Una de ellas el *Agastache mexicana* se divide a su vez en dos subespecies: *A. mexicana* subsp *mexicana* (toronjil morado) y *A. mexicana* subsp *xolocotziana* (toronjil blanco).^{1,2}

Agastache mexicana subsp *mexicana* es una hierba de unos 40 a 60 cm. Sus tallos son cuadrados. Sus hojas tienen forma de lanza y en su parte inferior son más anchas que en la superior, los bordes de las hojas son dentados y con pelos por el envés. Tiene flores en racimos terminales, en número de 5 hasta 20, con forma tubular, de color rojo vivo o rojo-morado y sus frutos son de color café.³

Figura II.1



Figura II.1 Flores de *A. mexicana* subsp *mexicana*

En la medicina tradicional, esta especie conocida como toronjil morado, se usa frecuentemente para tratar el “espanto”, como ocurre en los estados de México, Hidalgo, Michoacán, Morelos y Puebla. ³

2.2 Usos Etnobotánicos del Toronjil Morado

En el transcurso del tiempo el uso del toronjil ha variado, es utilizado como remedio para heridas, para tratar púrpuras infectadas y para curar la soriasis. Normalmente se utiliza mezclada con otras plantas medicinales.

Actualmente, infusiones de toronjil morado solo o en combinación con el toronjil blanco son ampliamente utilizadas para el tratamiento de los “nervios” o para curar el “espanto”. La infusión con toronjil morado, toronjil blanco y toronjil azul conocida como el remedio de los “tres toronjiles” tiene un amplio uso en la medicina tradicional mexicana como inductor del sueño, tranquilizante nervioso, para tratar el insomnio, padecimientos gastrointestinales y cardiovasculares.

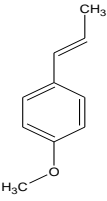
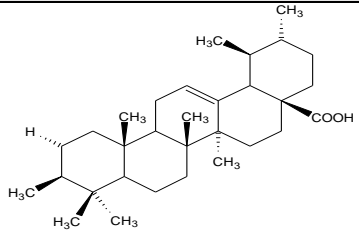
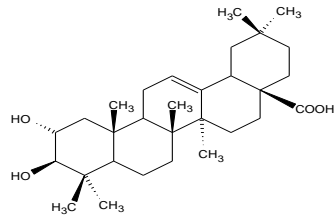
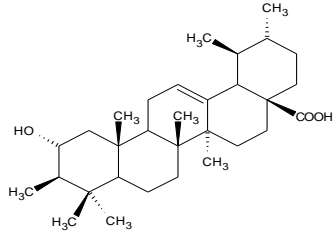
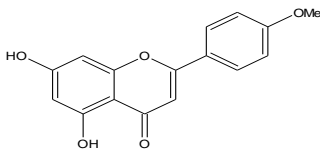
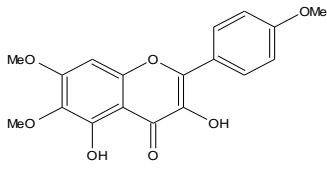
Se recomienda usar de preferencia la planta fresca, tomando de 2 a 4 g por 120 mL de agua de infusión, esta se usa como estomáquico y antiespasmódico. ⁴

El toronjil morado (*A. mexicana* subsp *mexicana*) es uno de los ejemplos más claros de uso y remedio en la medicina tradicional como un recurso primario para la cura de padecimientos relacionados con el sistema nervioso central (SNC) debido a sus propiedades sedantes. ⁵

2.3 Composición Química

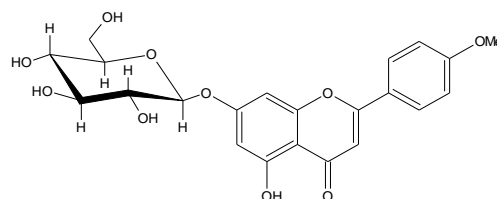
En un estudio comparativo sobre la composición química de *A. mexicana* subsp *mexicana* y otras especies se identificaron sus metabolitos secundarios. En el Cuadro II.1 se muestran los más abundantes para esta especie.

Cuadro II.1 Composición química de *A. mexicana* subsp *mexicana*¹

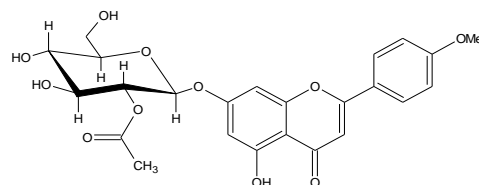
Toronjil Morado (<i>A. mexicana</i> subsp <i>mexicana</i>)	
Principales metabolitos secundarios no polares	
Metil chavicol	
Principales metabolitos secundarios de polaridad intermedia	
Ácido ursólico	
Ácido maslínico	
Ácido corosólico	
5-hidroxi-7,4' dimetil flavona (Acacetina)	
5-hidroxi-6,7,4'-trimetoxi flavona (Salvigenina)	

Principales metabolitos secundarios polares

7-O- β -D-glucopiranosido de la acetina
(Tilianina)



(2-acetil)-7-O- β -D-glucopiranosido de la acetina



Las especies pertenecientes a la familia Lamiaceae se caracteriza entre otras cosas, por la abundante presencia de metabolitos secundarios de tipo flavonoide, los cuales son útiles como marcadores quimiotaxonómicos en la clasificación de esta familia. Además estos metabolitos secundarios poseen diversas actividades farmacológicas entre las que se cuentan, por su importancia, sus efectos sobre el Sistema Nervioso Central (SNC).⁶

Los flavonoides son los metabolitos secundarios mayoritarios en los extractos polares de la especie *A. mexicana* subsp *mexicana*, estos son compuestos polifenólicos que constituyen un extenso grupo. Las principales sub-clases de flavonoides son flavonas, flavonoles, flavan-3-ol, antocianidina, flavanonas e isoflavonas (Figura II.2).

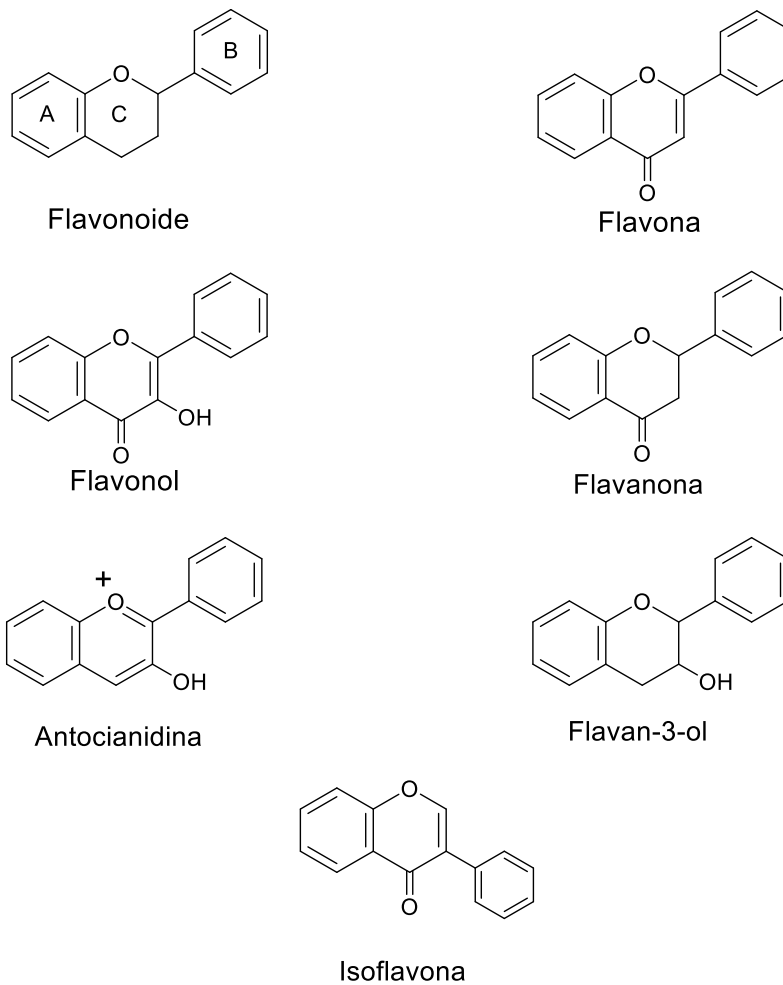


Figura II.2 Principales tipos de Flavonoides

El esqueleto base de los flavonoides puede tener numerosos sustituyentes, la mayoría de los flavonoides existen naturalmente como glicósidos.

Los flavonoides son responsables de la mayoría de los colores rojos, azules y amarillos que se observan en las flores. Numerosos flavonoides se han logrado aislar y purificar mediante técnicas cromatográficas, tales como cromatografía en columna en gel de sílice y elución con disolventes tales como cloroformo, acetona y metanol.⁷

2.4 Flavonoides con Actividad Biológica

Debido a sus características estructurales varios de estos metabolitos secundarios poseen diferentes propiedades biológicas. En general los flavonoides tienen propiedades antiinflamatorias, antioxidantes, antialérgicas, hepatoprotectora, antimicrobiana, antiviral y actividad anticancerosa. Así mismo, ha sido demostrado en estudios *in vitro*, que estos metabolitos secundarios tienen actividad en sistemas enzimáticos. ⁸

Numerosos estudios sugieren que la actividad antiinflamatoria de los flavonoides se debe a su capacidad de modular especies reactivas de oxígeno (ROS) producidas por fagocitos. Los fagocitos pueden generar altos niveles de ROS en sitios de inflamación que contribuyen a una lesión tisular local, esto puede llevar al desarrollo de condiciones de inflamación crónica. ⁹

Ferriola (1989) demostró que la quercetina y luteolina (Figura II.3) fueron los flavonoides más activos al inhibir la enzima proteína cinasa C (PKC), la cual está involucrada en procesos tales como formación de tumores, mitogénesis y procesos inflamatorios entre otros.

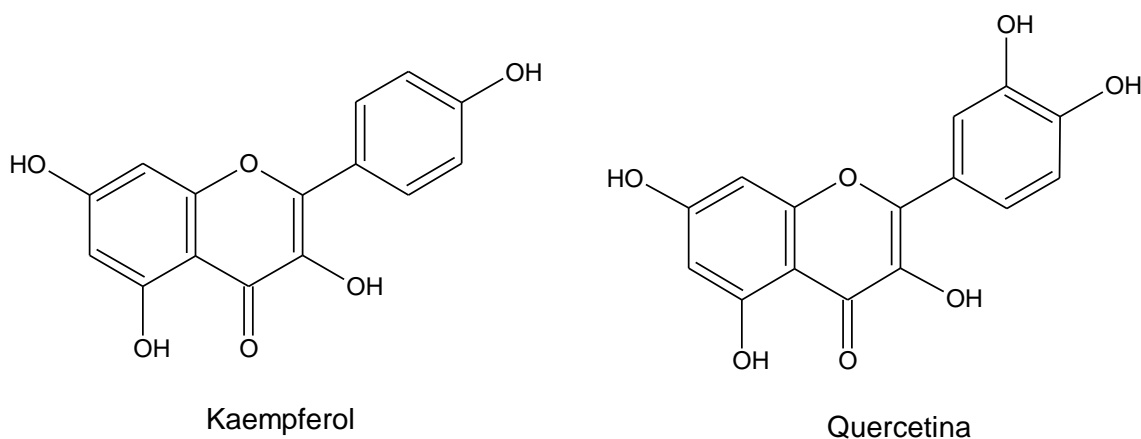


Figura II.3 Estructura química del kaempferol y quercetina, flavonoides con actividad biológica

La quercetina tiene actividades antioxidantes, antitumorales, y propiedades antiinflamatorias, la cual ha sido estudiada ampliamente como agente quimiopreventivo en varios modelos de cáncer.

Estudios recientes han demostrado que la quercetina, a dosis bajas inhibe la proliferación celular por apoptosis y/o detención del ciclo celular pero a dosis altas tiene un efecto genotóxico al inducir daño al ADN. ¹⁰

2.5 Actividad Biológica del 7-O-β-D-glucopiranosido de la acetina (Tilianina)

Se ha demostrado que la flavona tilianina tiene actividad sobre el SNC, manifestando un efecto sedante en dos modelos experimentales con ratones: el modelo de tiempo de sueño, inducido por pentobarbital, así como en el modelo del tablero con perforaciones.

Este mismo estudio indica que la tilianina tiene un efecto inhibitorio similar al ejercido por GABA, principal neurotransmisor inhibitorio del SNC, el cual sirve para disminuir la actividad nerviosa en el cerebro. Adicionalmente se demostró que la tilianina incrementó la actividad inhibitoria en hipotálamo, lo cual supone que está ligada a la síntesis o recaptura de GABA. ⁵

Otro estudio, en ratas Wistar, demostró que la tilianina indujo significativamente ($p < 0.05$) la vaso relajación a concentraciones de 0.002 μM en anillos de aorta previamente contraídos con noradrenalina (0.1 μM), efecto mediado por la liberación de óxido nítrico (NO) y la apertura de canales de potasio (K^+).

Adicionalmente, la administración por vía oral de tilianina (50 mg/Kg) en ratas SHR (hipertensas) exhibe un decremento significativo en la presión sistólica y diastólica ($p < 0.05$), lo que demuestra su efecto antihipertensivo. ¹¹

No obstante del extendido uso del toronjil morado en la herbolaria tradicional, no se han estudiado los efectos genotóxico y citotóxico *in vivo* del extracto acuoso de *A. mexicana* subsp *mexicana*; así como de la flavona 7-O- β -D-glucopiranosido de la acetina, principal metabolito secundario del extracto acuoso de ésta especie. En la Figura II.4 se muestra la estructura química del 7-O- β -D-glucopiranosido de la acetina.

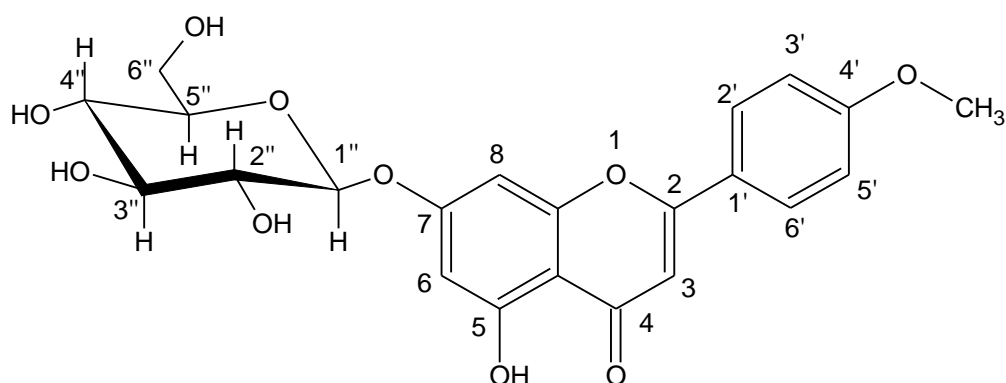


Figura II.4 Estructura química del 7-O- β -D-glucopiranosido de la acetina (tilianina)

2.6 Genotoxicidad

El estudio del daño al ADN es una parte esencial para evaluar los efectos mutágenos de sustancias químicas, radiaciones y otros factores físicos y biológicos.

Existen varias pruebas tanto *in vitro* como *in vivo* que permiten evaluar los efectos tóxicos de compuestos químicos, sus riesgos y consecuencias para el organismo. ¹²

2.7 Electroforesis Unicelular Alcalina (Ensayo Cometa)

El ensayo cometa o electroforesis unicelular fue introducido originalmente por Östling y Johanson en 1984 como una técnica micro-electroforética para visualizar el daño del ADN en células individuales obtenidas de biopsias en pacientes con cáncer sometidos a terapia con radiación. Las células suspendidas en un gel de agarosa sobre un portaobjetos, formando un microgel que posteriormente sumergieron en una solución para romper las células y poder visualizar los núcleos, los geles se sometieron a una electroforesis neutra, para evidenciar la fragmentación de la cadena doble de ADN y posteriormente se tiñeron con bromuro de etidio para observar los núcleos.

Las imágenes obtenidas de estos núcleos fueron llamadas “cometas” por su semejanza a estos. En 1988, Singh et al. mejoraron la técnica introduciendo una electroforesis alcalina ($\text{pH}>13$), que a diferencia de la neutra mejora el desenrollamiento del ADN y la separación de proteínas asociadas, incrementando la movilidad y visualización de los fragmentos de ADN, debido a esto se pueden observar rupturas de cadena sencilla y doble; lesiones en los sitios sensibles al álcali y en sitios de reparación retardada del ADN; ofreciendo mayor sensibilidad para detectar agentes genotóxicos.

La versión alcalina ($\text{pH}>13$) de la electroforesis en el ensayo cometa, fue considerada la mejor y aceptada por el panel Internacional Workshop on Genotoxicity Test Procedures como el ensayo de genotoxicidad más sensible, en comparación con otros y recientemente se ha usado esta técnica para detectar apoptosis y diferenciarla de la necrosis.^{13, 14}

En la Figura II.5 se observan células que han sufrido daño al ADN mediante la técnica Cometa.

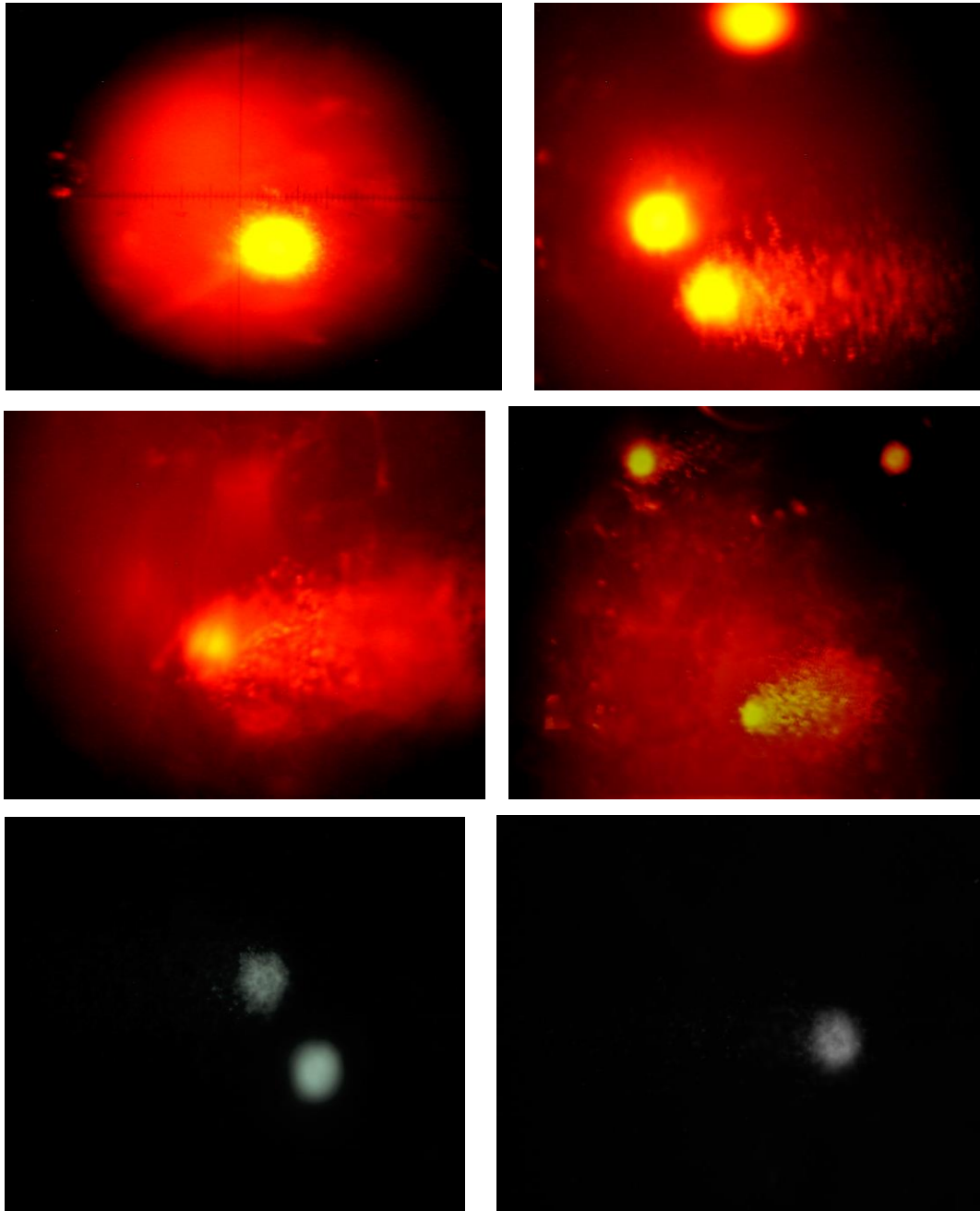


Figura II.5 Células con daño al ADN mediante la técnica Cometa.

2.8 Ensayo con Micronúcleos

El ensayo de micronúcleos es una herramienta básica para evaluar la habilidad de algunos agentes para inducir daño estructural o numérico a los cromosomas, ambos tipos de daño están asociados con la aparición y progresión de tumores. ¹⁵

Los micronúcleos son pequeñas estructuras similares al núcleo principal que se encuentran presentes en el citoplasma. Ellos son formados por cromosomas o fragmentos de cromosomas que no fueron incorporados hacia algunos de los núcleos de las células hijas durante la mitosis o meiosis.

Esto ocurre debido a que estos cromosomas o fragmentos perdieron su conexión al centrómero o bien no pudieron ser atraídos por el huso, en consecuencia no pudieron alinearse correctamente durante la metafase y por ende no fueron segregados hacia alguno de los polos durante la anafase.

En la telofase, el material cromosómico perdido puede ser encapsulado en una membrana nuclear y, después de la citocinesis, aparecen como pequeñas estructuras redondeadas en algunas de las células hijas.

Los micronúcleos están presentes en bajas frecuencias (aproximadamente 1-10 por millón de células) en la mayoría de los tipos celulares. Debido a que son visibles y relativamente fáciles de contar en células interfásicas, estos pueden ser usados ampliamente para el monitoreo de daño cromosómico.

Esta prueba es ampliamente usada y la elección de los modelos que se utilizan básicamente depende de la información que uno desee obtener de un sistema determinado. ^{16, 17}

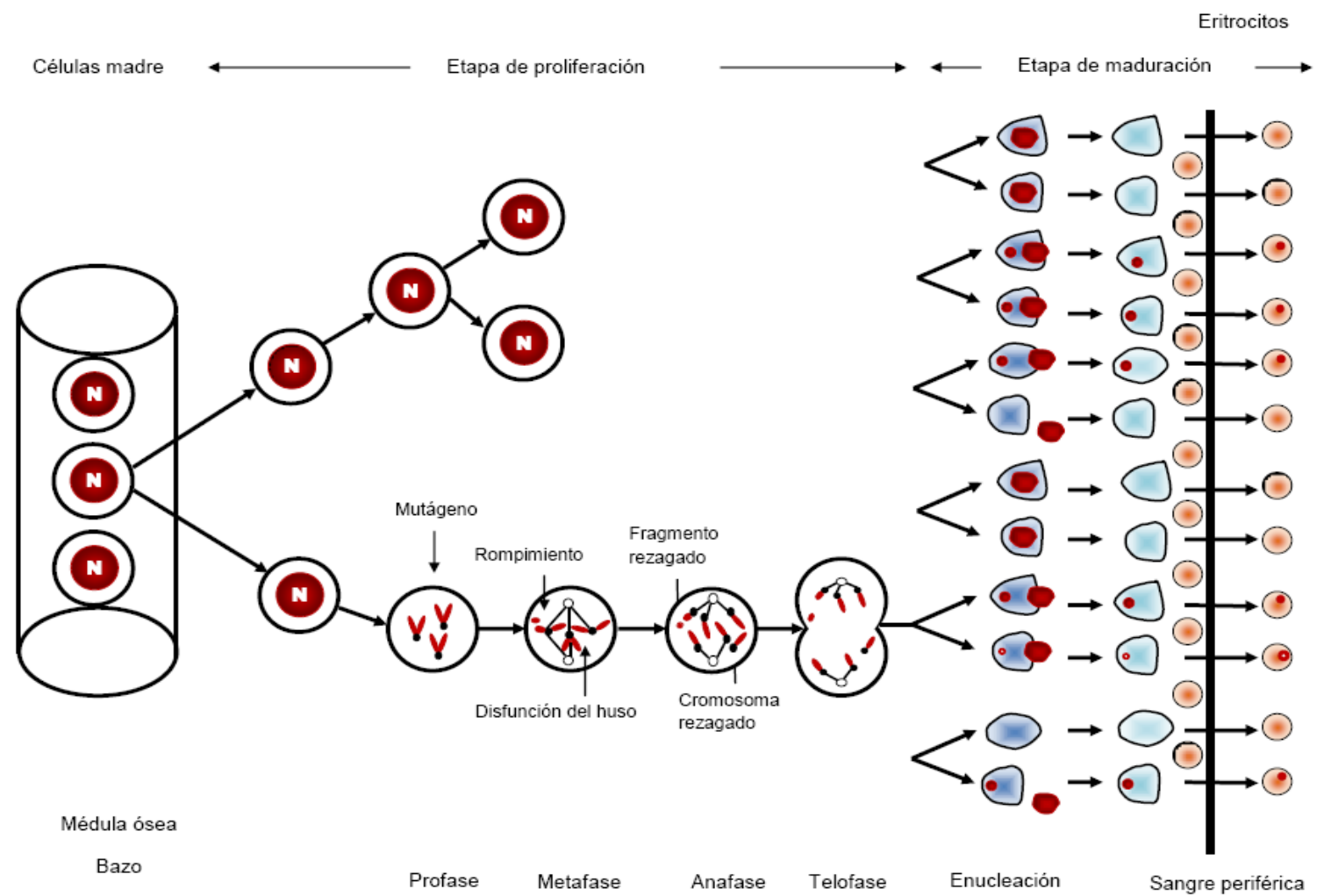


Figura II.6 Mecanismo de formación de micronúcleos en eritrocitos policromáticos (EPC) y normocromáticos (ENC)

2.9 Viabilidad Celular

Los métodos por exclusión con colorantes son tradicionalmente usados para la evaluación de la viabilidad celular. Así el uso del azul de tripano es uno de los más comunes. El azul de tripano (azul Diamina, azul Niagara, azul vital) es un colorante derivado de la toluidina que posee la capacidad de teñir tejidos y células muertas. Su nombre se deriva de su capacidad para matar a los Tripanosomas. Este colorante es uno de varios empleados para evaluar la viabilidad de células por exclusión de captación, ya que no puede penetrar y teñir a las células vivas con membranas íntegras. El azul de tripano no es necesario para realizar conteos simples de células pero sí es imprescindible para diferenciar entre las células muertas (con disrupción membranal) de las vivas con membranas íntegras. En este procedimiento, una suspensión de células mononucleares (CMN) es mezclada con una solución al 0.4% de azul de tripano antes de ser observadas bajo el microscopio ¹⁸. La Figura II.7 muestra un ejemplo de la tinción con azul de tripano.

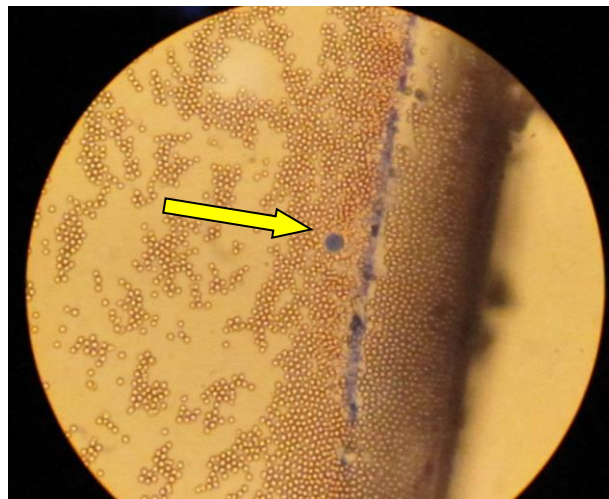


Figura II.7 Viabilidad celular.

El amplio uso de las plantas medicinales en el tratamiento de diferentes enfermedades y considerando la complejidad y su inherente variación biológica hace necesario evaluar su seguridad, eficacia y calidad.

En diferentes poblaciones de México, las plantas comúnmente utilizadas para padecimientos como hipertensión y enfermedades relacionadas son el toronjil morado (*A. mexicana* subsp *mexicana*), esta especie se ha estudiado desde el punto de vista farmacológico (Galindo, 1982; Contreras, 1987), quimiotaxonómico (Espíritu, 1991; Estrada, 2004) y fitoquímico (Aguirre, 2003). Sin embargo, son pocos los estudios realizados para evaluar la actividad biológica tanto de la especie como de sus metabolitos secundarios polares. Por lo tanto es de gran importancia determinar su posible potencial mutagénico.

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En la medicina tradicional mexicana el uso de plantas medicinales en forma de infusiones o emplastos es una práctica muy extendida y la persistencia en el uso de especies medicinales en comunidades rurales o urbanas debe ser considerada una buena evidencia de su eficacia. ¹⁹

El empleo de los toronjiles para diversas enfermedades es conocido desde la época prehispánica, actualmente estas plantas son empleadas en el tratamiento de desórdenes como el insomnio, nervios, impresiones, susto o por sus propiedades tranquilizantes.

Nuestro grupo ha demostrado que la especie *Agastache mexicana* subsp *mexicana* tiene metabolitos secundarios principalmente flavonoides del tipo acacetina, salvigenina, algunos de estos metabolitos polares son derivados de la glucosil acacetina como el 7-O-β-D-glucopiranosido de la acacetina (tilianina) y pilosina, los cuales presentan actividad analgésica, antiinflamatoria y acción en el sistema nervioso central ⁶. Sin embargo no se saben sus posibles efectos genotóxicos y citotóxicos, de ahí planteamos la siguiente pregunta de investigación:

¿El extracto acuso de *A. mexicana* subsp *mexicana* y del 7-O-β-D-glucopiranosido de la acacetina (tilianina) aislado de esta especie presentaran propiedades citotóxicas y genotóxicas en los modelos de micronúcleos y electroforesis unicelular alcalina?

IV. HIPÓTESIS

Se ha demostrado que algunos flavonoides antidepresivos biosintetizados por especies medicinales no solo poseen efecto antígenotóxico y no son citotóxicos, por lo tanto suponemos que el glucósido antidepresivo tilianina, aislado de *A. mexicana* subsp *mexicana* así como algunos de sus extractos no presentarán actividades citotóxicas y genotóxicas.

V. OBJETIVOS

5.1 Objetivo General

Evaluar las actividades genotóxicas y citotóxicas del extracto acuoso y del 7-O- β -D-glucopiranosido de la acacetina (tilianina) obtenidos de la especie *A. mexicana* subsp *mexicana* (toronjil morado) mediante el modelo con micronúcleos y electroforesis unicelular alcalina (cometa).

5.2 Objetivos Particulares

- Purificar e identificar el 7-O- β -D-glucopiranosido de la acacetina (tilianina) a partir del extracto metanólico.
- Evaluar la actividad genotóxica del extracto acuoso y de la tilianina en el modelo cometa alcalino y micronúcleos en sangre periférica de ratón CD1.
- Evaluar la actividad citotóxica del extracto acuoso y de la tilianina mediante el método de exclusión con azul de tripano.

VI. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 Diseño (Tipo de Estudio)

Experimental

6.2 Universo (Población o Muestra)

100 Ratones Macho CD1

6.3 Variables

6.3.1 Variables Independientes

Tratamiento {
Vehículo
Control Positivo (+)
Extracto acuoso de *A. mexicana subsp mexicana*
Tilianina

6.3.2 Variables Dependientes

- Citotoxicidad: Medida por el ensayo de tinción por exclusión con azul de tripano.
- Genotoxicidad: Evaluando la cantidad eritrocitos policromáticos micronucleados (EPC-MN) mediante el ensayo con micronúcleos y la fragmentación del ADN por la técnica de electroforesis unicelular alcalina (cometa).

6.4 Materiales

- Se utilizaron columnas cromatográficas de vidrio (6.5 cm de diámetro x 60 cm de largo, 2 cm de diámetro x 25 cm de largo)
- La identificación y la pureza de los compuestos se llevó a cabo por medio de cromatografía en capa fina (CCF) utilizando cromatofolios de aluminio cubiertos de sílice DC Fertigplatten Sil G-200, UV (Merck), de 0.2 mm de espesor
- En la cromatografía en columna (CC) se utilizó como fase estacionaria gel de sílice 60 Ahigram Sil G, kiesel, malla 70-230, (Merck), con indicador de fluorescencia UV 254.
- Portaobjetos esmerilado (Fisher, EUA)
- Portaobjetos pulidos (Lauka)

6.5 Reactivos

- Como revelador se empleo una disolución de sulfato cérico al 1 % en ácido sulfúrico 2 N
- Agua destilada
- Agua desionizada
- Agarosa de bajo punto de fusión (LMPA 0.5 % Gibco)
- Agarosa normal (1 %, Gibco)
- Na₂ EDTA
- Tritón 1% X-100

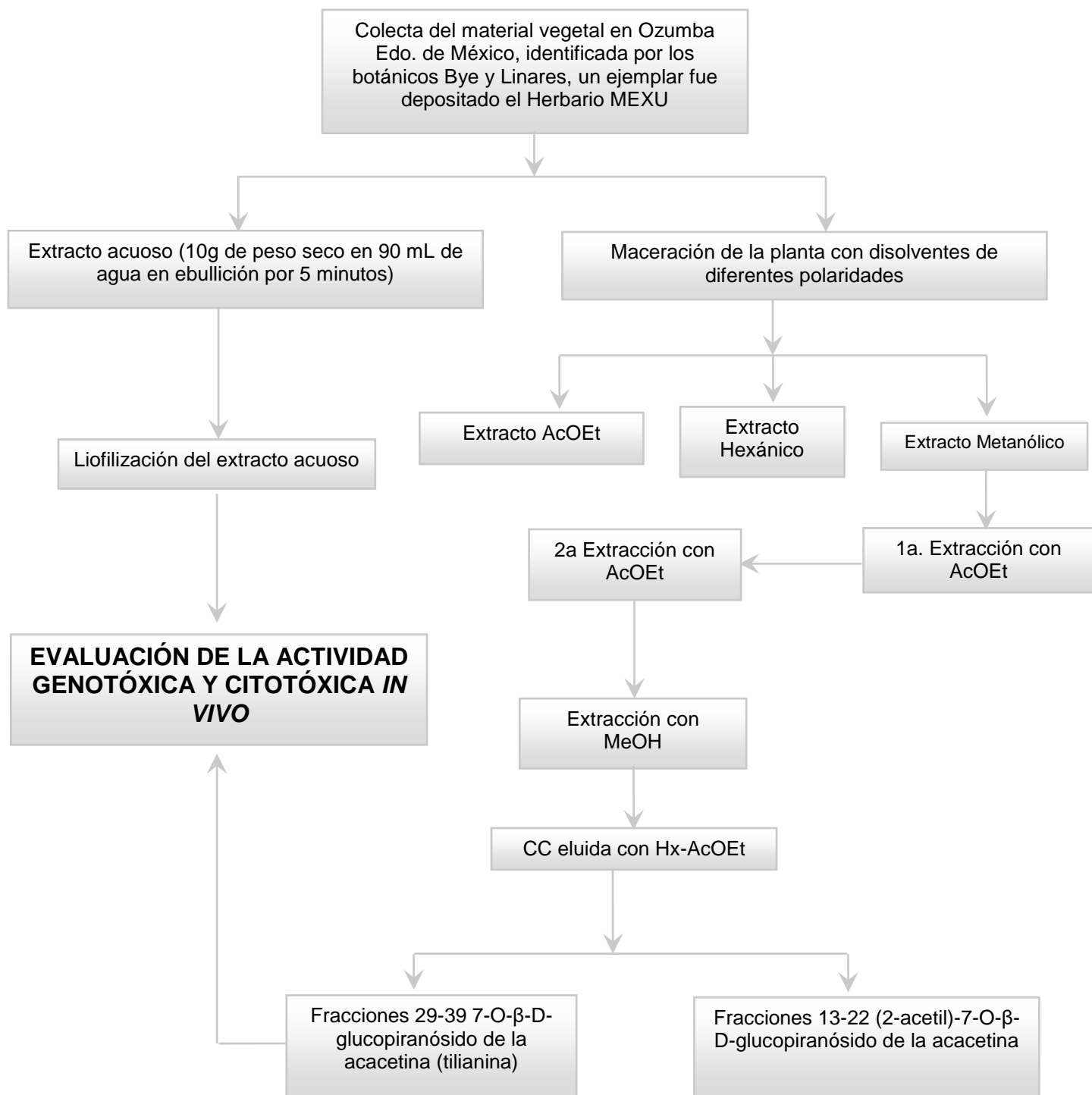
- DMSO
- Naranja de Acridina (Sigma)
- Azul de tripano (0.4 %, Sigma)
- Bromuro de etidio
- Genoxal ® (Ciclofosfamida, Baxter)

6.6 Equipos

- Las partes aéreas de la planta se molieron en una licuadora industrial marca Philips 3000.
- La evaporación de los disolventes se realizó en un rotavapor Buchi 110.
- Los puntos de fusión fueron determinados en un aparato Fischer Jones y no están corregidos.
- Lámpara de luz UV de 254 y 365 nm (Cole Parmer 9815 series Lamps).
- Equipo de liofilización.
- Los espectros de Infrarrojo (IR) fueron realizados en un espectrofotómetro FT-IR Nicolet Magna 750.
- Los espectros de Resonancia Magnética Nuclear de ^1H (RMN- ^1H) y ^{13}C (RMN- ^{13}C) fueron realizados en un aparato Varian Unity.
- El análisis por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (CLAR) se llevó a cabo en un equipo HP series 1100, con una columna Synergi polar-RP y detector de arreglo de diodos.

- Cámara de electroforesis horizontal (Bioselect) utilizada para el ensayo cometa alcalino.
- Microscopio de fluorescencia (Axiostar Plus Zeiss fluorescent), equipado con filtro de excitación de 515-560 nm y un filtro de barrera de 590 nm, para llevar a cabo las lecturas de las muestras en el ensayo cometa y en el ensayo con micronúcleos.

6.7 Diagrama de Flujo del Estudio Químico.



6.7.1 Estudio Químico

6.7.2. Colecta del Material Vegetal.

Las flores de *Agastache mexicana* subsp *mexicana* se colectaron en San José Tlacotitlán Ozumba, Estado de México en agosto del año 2009. Un ejemplar se depositó en el Herbario Nacional del Instituto de Biología de la Universidad Nacional Autónoma de México, la Figura VI.1 Muestra las partes aéreas de *A. mexicana* subsp *mexicana*.



Figura VI.1 Partes aéreas de *A. mexicana* subsp *mexicana*

6.7.3 Obtención del Extracto Acuoso

10 g de flores secas y molidas se colocaron en 90 mL de agua destilada en ebullición durante 5 minutos. La infusión obtenida se dejó enfriar, se filtró a vacío y se liofilizó obteniéndose 4.5 g de extracto seco.

6.7.4 Obtención del Extracto de Metanol

Flores secas y molidas (500 g) fueron extraídas vía maceración con MeOH durante un periodo de 72 h, al término de este tiempo se evaporó el disolvente a presión reducida obteniendo un total de 50.57 g del extracto respectivo equivalente al 10% de rendimiento.

6.7.5 Aislamiento e Identificación del (2-acetil)-7-O- β -D-glucopiranosido de la acacetina y del 7-O- β -D-glucopiranosido de la acacetina (Tilianina).

Con el fin de eliminar los compuestos de polaridad intermedia, el extracto metanólico se extrajo tres veces con acetato de etilo (AcOEt). La parte insoluble en AcOEt se lavó con metanol (MeOH), obteniéndose una solución y un residuo sólido. La evaporación del disolvente de la solución permitió obtener 20.89 g de un sólido amorfo (SA) como se muestra en la Figura VI.2. La separación del SA se llevó a cabo mediante una cromatografía en columna (CC) utilizando gel de sílice como fase estacionaria y eluida con mezclas de disolventes de polaridad ascendente, iniciando con una mezcla de hexano-AcOEt (1:2) e incrementando consecutivamente la polaridad hasta llegar al 100% de MeOH como se observa en el Cuadro VI.1



Figura VI.2 Evaporación de disolventes

Cuadro VI.1 Fraccionamiento de la CC del extracto de metanol de la especie *A. mexicana* subsp *mexicana*.

ELUYENTE	PROPORCIÓN	FRACCIONES
Hexano - AcOEt	1:2	1 - 69
AcOEt	100	70 - 76
AcOEt – MeOH	9:1	77 – 112
AcOEt - MeOH	1:1	113 – 141
MeOH	100	142 - 172

De las fracciones 13 a 28, eluidas con hexano:AcOEt (1:2) se obtuvo el (2-acetil)-7-O- β -D-glucopiranosido de la acetina y de las fracciones 29 a 54, eluidas con la misma mezcla de disolventes se obtuvo la tilianina.

La purificación de los compuestos aislados se realizó mediante la precipitación con disolventes de diferentes polaridades.

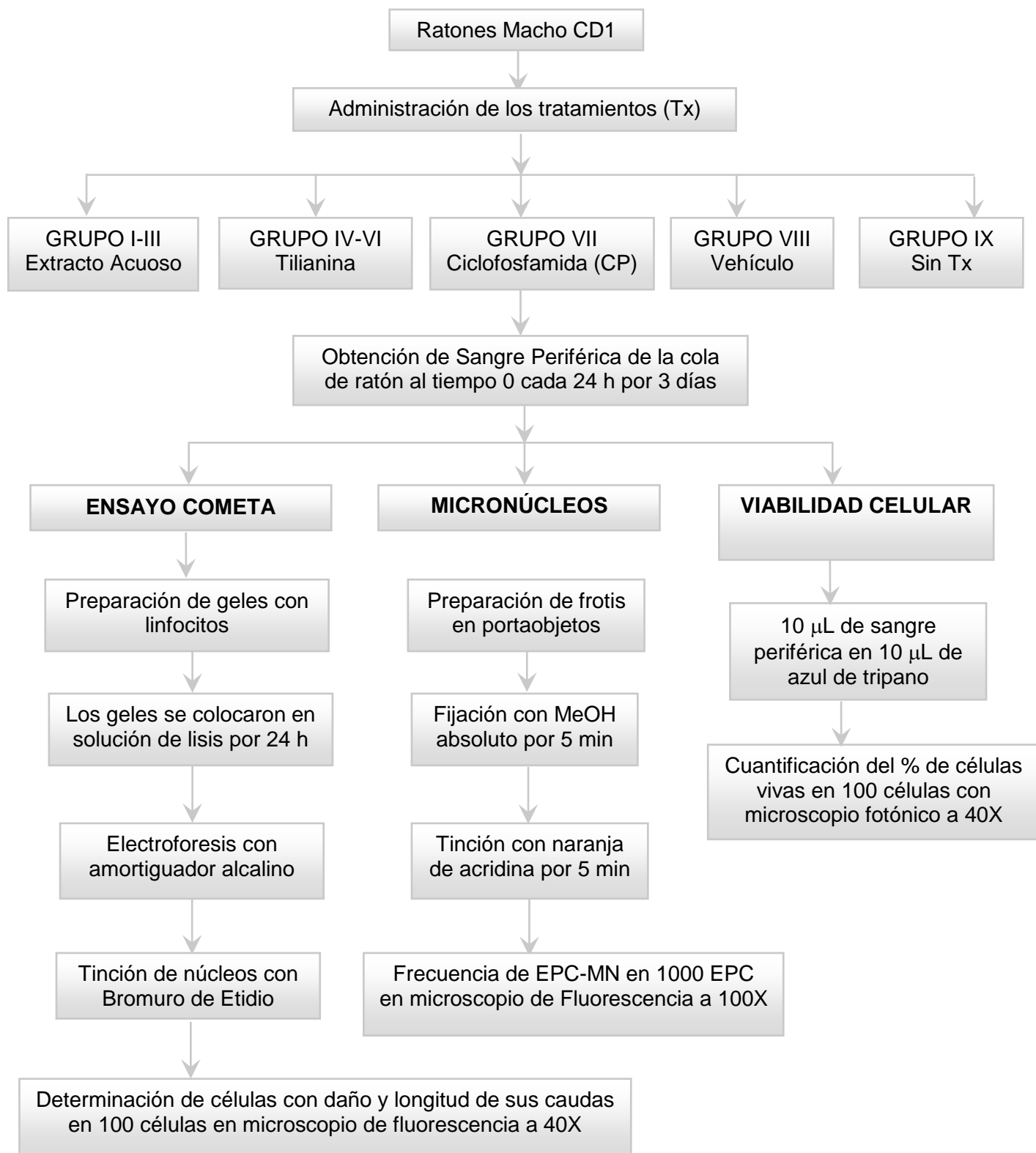
La identificación del (2-acetil)-7-O- β -D-glucopiranosido de la acetina y de la tilianina, se logró por la comparación de sus datos físicos y espectroscópicos con aquellos publicados para estos metabolitos secundarios.

La presencia de la tilianina y el (2-acetil)-7-O- β -D-glucopiranosido de la acetina en el extracto acuoso se determinó por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (CLAR). En la Figura VI.3 se muestran los compuestos aislados de *A. mexicana* subsp *mexicana* así como el extracto acuoso liofilizado.



Figura VI.3 Aislamiento de los metabolitos secundarios de *A. mexicana* subsp *mexicana*

6.8 Diagrama de Flujo del Estudio Biológico



6.8.1 Estudio Biológico

6.8.2 Animales y Dosificación

Para la evaluación de las actividades genotóxicas y citotóxicas del extracto acuoso de *A. mexicana* subsp *mexicana* y de la tiliania se utilizaron ratones machos de la cepa CD1 de aproximadamente dos meses de edad con un rango de peso de 20-30 g, los cuales fueron divididos en grupos de 5 animales como se muestra en la Figura VI.4. A cada grupo se le administraron diferentes dosis.

Las dosis administradas del extracto acuoso fueron 100, 200 y 1000 mg/Kg mientras que para la tilianina se administraron dosis de 20, 80 y 320 mg/Kg de peso corporal, ambos por vía intraperitoneal (IP). Se utilizó solución fisiológica (NaCl 0.9%), como vehículo en el extracto acuoso y Tween al 1% como vehículo en la administración de la tilianina. Como control positivo se usó ciclofosfamida (CP) a una dosis de 40 mg/Kg como se muestra en el esquema de dosificación en el Cuadro VI.2 y en la Figura VI.5.



Figura VI.4 Identificación de ratones CD1 por grupos.

Cuadro VI.2 Esquema de dosificación y agrupamiento de ratones CD1 para cada tratamiento.

Grupos (n=5 ratones)	Dosis mg/kg	Tratamiento
I	100	Extracto Acuoso
II	200	Extracto Acuoso
III	1000	Extracto Acuoso
IV	20	Tilianina
V	80	Tilianina
VI	320	Tilianina
VII	40	CP Control (+)
VIII	-	Tween 1% (Vehículo)
IX	Testigo (-)	-

Los ratones se mantuvieron bajo condiciones controladas de temperatura ($20 \pm 2^\circ\text{C}$), humedad relativa (40-60%) y fotoperiodo (12 h luz: 12 h oscuridad) con libre acceso a agua y dieta comercial *ad libitum*. Todos los ratones utilizados fueron tratados de acuerdo a las guías de uso de animales de laboratorio.²⁰



Figura VI.5 Administración del extracto acuoso y de la tilianina.

Para la evaluación de la actividad genotóxica con el ensayo cometa y micronúcleos se tomaron las muestras de sangre periférica de ratón CD1 simultáneamente. Figura VI.6

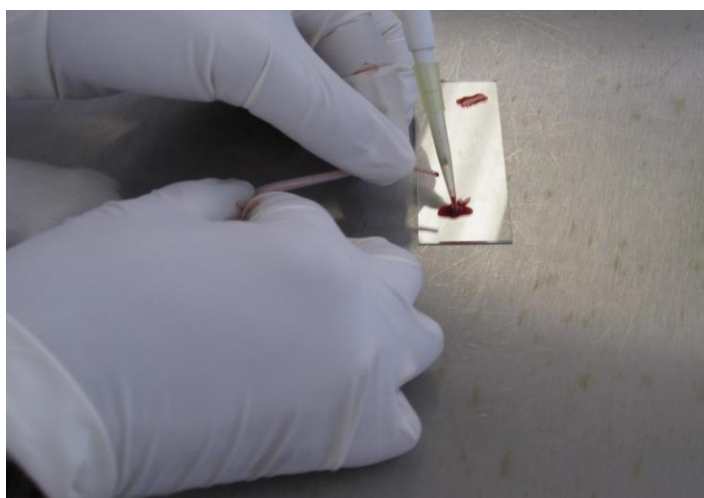


Figura VI.6 Muestras de sangre periférica de ratón CD1

6.8.3 Ensayo Cometa Alcalino

Se realizó el ensayo cometa alcalino de la siguiente manera:

- Se tomaron 5 μL de sangre periférica más 75 μL de agarosa de bajo punto de fusión (LMPA 0.5 % Gibco) a 37 °C.
- Se colocaron en un portaobjetos esmerilado (Fisher, EUA) con una monocapa de agarosa normal (1 %, Gibco) (por duplicado).
- Los portaobjetos se dejaron solidificar a 4 °C por 5 min, después los geles fueron sumergidos en una solución fresca de lisis final fría (2.5 M NaCl, 100 mM Na₂EDTA, 1 % Triton X-100 y 10 % DMSO, 10 mM Tris, ajustada a pH=10) por 1 h.
- Posteriormente, los geles fueron transferidos a una cámara de electroforesis horizontal (Bioselect) con amortiguador alcalino frío (300 mM NaOH, 1mM EDTA, pH=13), por 20 min para desenrollar el ADN y se aplicó una corriente de 25 V, 300 mA por 20 min.
- Los portaobjetos fueron lavados tres veces con amortiguador neutralizante (0.4 M Tris a pH 7.5) por 5 min, se fijaron en metanol absoluto frío por 10 min, fueron secados al aire en oscuridad y guardados en una caja negra para posteriormente ser analizados.
- Los geles de todos los lotes experimentales, fueron teñidos con bromuro de etidio (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) para examinar el daño sobre el ADN con un objetivo micrométrico a 40X en 100 células por lámina para determinar la frecuencia de células con cometa y la longitud de sus caudas (Figura VI.7) en un microscopio de fluorescencia (Axiostar Plus Zeiss fluorescent), equipado con filtro de excitación de 515-560 nm y un filtro de barrera de 590 nm.^{21, 22,}

23.

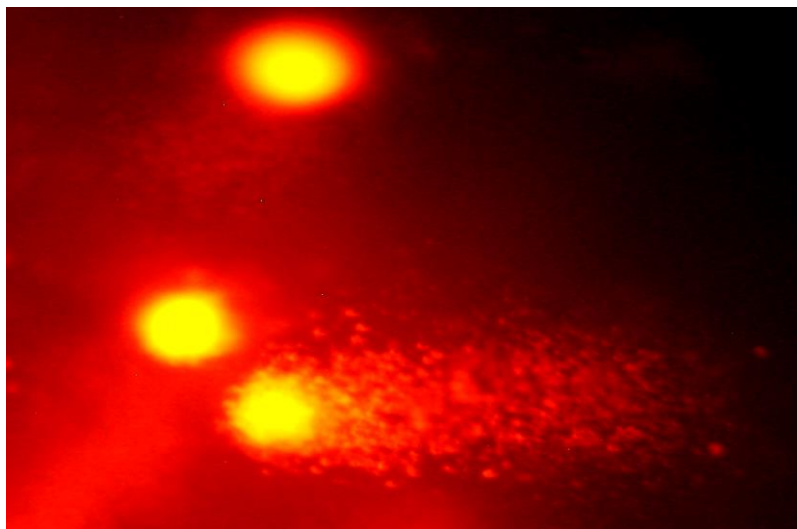


Figura VI.7 Daño al ADN (fragmentación) en sangre periférica de ratón CD1 inducido por el extracto acuoso de *A. mexicana* subsp *mexicana*.

6.8.4 Ensayo con Micronúcleos

- Previo a la administración de los compuestos a evaluar, se realizó un frotis sanguíneo, por corte de la porción terminal de la cola del ratón.
- Los compuestos se administraron vía intraperitoneal y a continuación se hicieron frotis por duplicado cada 24 h por 3 días.
- Se colocó una gota de sangre sobre un portaobjetos y se extendió con ayuda de otro porta objetos. Las laminillas se fijaron con metanol durante cinco minutos y fueron secadas al aire.
- Transcurrido este tiempo se tiñeron con Naranja de Acridina preparada en una solución amortiguadora de fosfato pH 6.8, a una concentración final de 125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ durante 5 min.

- Posteriormente, se hicieron 2 lavados con solución amortiguadora de fosfatos cada uno de 5 min con agitación constante, dejando secar al aire.
- Las laminillas se observaron al microscopio de fluorescencia a 100X (Figura VI.8) para determinar la frecuencia de eritrocitos policromáticos micronucleados (EPC-MN) en 1000 eritrocitos policromáticos (EPC), lo que permitió evaluar la genotoxicidad. ^{24, 25, 26}

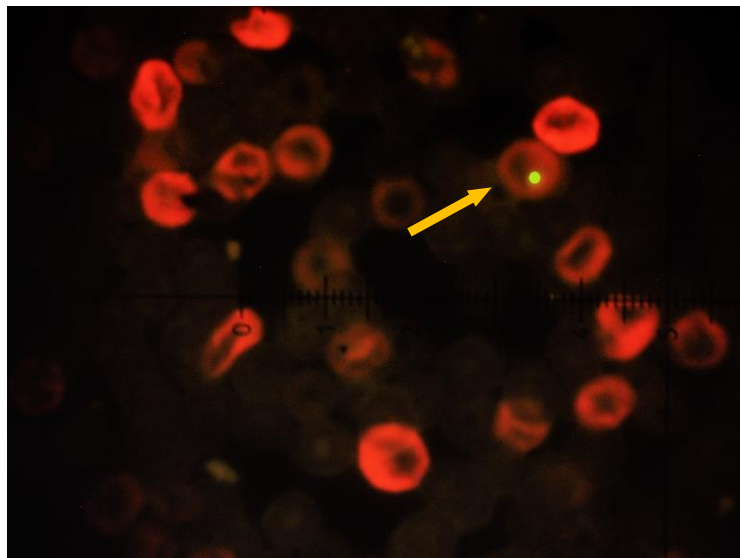


Figura VI.8 MN/EPC en sangre periférica de ratón CD1.

6.8.5 Viabilidad Celular

La viabilidad celular fue analizada de acuerdo con la técnica de tinción por exclusión con Azul tripano de Altmann et al. 1993. Se mezcló 10 μ l de sangre periférica de ratón CD1 más 10 μ l de azul tripano (0.4%, Sigma), después se cuantificó el porcentaje de células vivas en 100 células consecutivas, por duplicado para cada grupo experimental incluyendo el testigo, con un microscopio fotónico a 40 X como se muestra en la Figura VI.9.

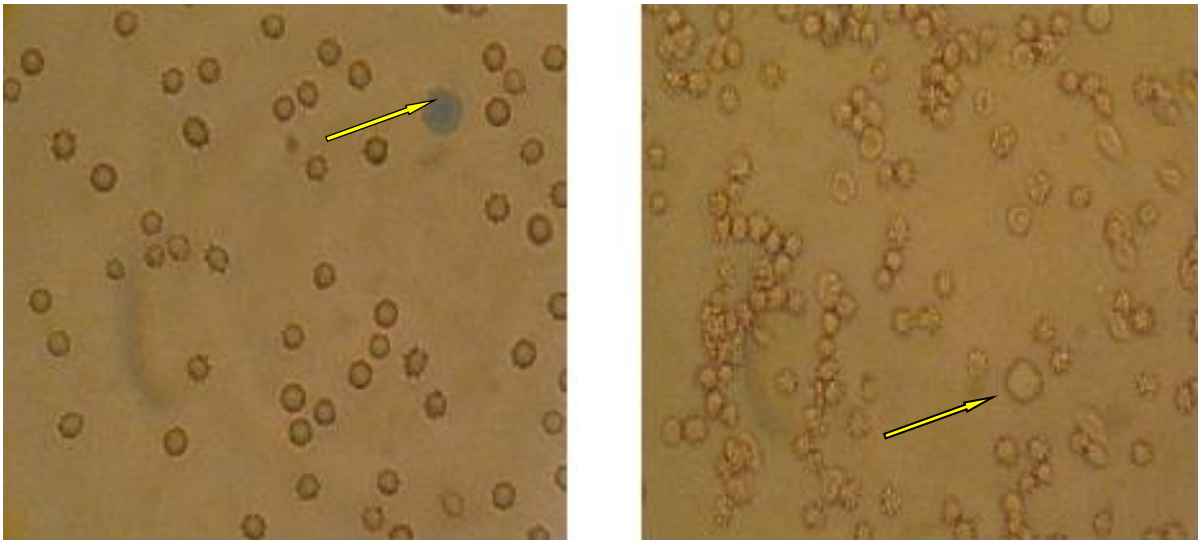


Figura VI.9 Viabilidad celular en sangre periférica de ratón CD1.

VII. RESULTADOS Y ANÁLISIS

7.1 Estudio Químico

Del extracto de metanol de las flores de *Agastache mexicana* subsp *mexicana* se aislaron los glicósidos de flavonas 7-O- β -D-glucopiraósido de la acacetina (tilianina) y el (2-acetil)-7-O- β -D-glucopiranósido de la acacetina. Ambos glucósidos se caracterizaron, por la comparación de sus datos físicos y espectroscópicos con aquellos publicados para estos metabolitos secundarios.

7.1.1 Obtención de Extractos y Aislamiento de los Glucósidos de Flavonoide

El extracto acuoso liofilizado se obtuvo a partir de 90 g de planta seca. Los glucósidos tilianina y el (2-acetil)-7-O- β -D-glucopiranósido de la acacetina se obtuvieron a partir de 50.57 g del extracto de metanol del toronjil morado.

Los resultados experimentales muestran un rendimiento de 1.0043% para la tilianina y 0.296% para (2-acetil)-7-O- β -D-glucopiranósido de la acacetina. Estos rendimientos concuerdan con estudios previos de la especie ^{1, 4}.

En el Cuadro VII.1 se muestran los rendimientos en mg, el peso molecular (g/mol), la descripción y puntos de fusión de la tilianina y el (2-acetil)-7-O- β -D-glucopiranósido de la acacetina; así como del extracto acuoso, obtenidos de la especie *A. mexicana* subsp *mexicana*.

La Identificación de la tilianina y el (2-acetil)-7-O- β -D-glucopiranósido de la acacetina se llevó a cabo mediante la comparación de sus datos físicos y espectroscópicos con los informados en la literatura.

Cuadro VII.1 Compuestos aislados de *A. mexicana* subsp *mexicana*. Rendimientos y puntos de fusión

	Tilianina	(2-acetil)-7-O-β-D-glucopiranosido de la acetina	Extracto Acuoso
Rendimiento (%)	1.0043	0.296	-
Cantidad (mg)	209.8	60.0	4500
Peso Molecular (g/mol)	446	488	-
Pf. (°C)	236-237	238-240	-
Descripción	Sólido color amarillo	Sólido color amarillo	Sólido color café (Liofilizado)

7.1.2 Elucidación Estructural de la Tilianina.

El espectro IR de la tilianina (Espectro 1, ANEXO) muestra una banda característica para grupos hidroxilo a 3434 cm^{-1} , en 2923 cm^{-1} se observa una banda correspondiente a enlaces C-H y en 1657 cm^{-1} una banda típica de un carbonilo α - β insaturado y a 1607 cm^{-1} una banda que pertenece a una doble ligadura.

En el espectro de RMN- ^1H de este compuesto (Cuadro VII.2, Espectro 2) se observa en 12.91 ppm un singulete asignado al grupo hidroxilo en el C-5. El desplazamiento a campo bajo se debe a que éste protón está formando un enlace de hidrógeno con el carbonilo del C-4 de la estructura base del flavonoide.

En aproximadamente 7.12 ppm se localiza una señal doble ($J = 9.0\text{ Hz}$) que corresponde a los protones aromáticos H-3' y H-5', mientras que en 8.6 ppm ($J = 9.0\text{ Hz}$) se localizan los protones aromáticos H-2' y H-6', las cuales forman parte de un sistema AA'BB'.

A δ 6.96 se observa un singulete que corresponde al protón vinílico H-3, mientras en δ 3.85 una señal que corresponde al metilo del grupo metoxilo (O-CH₃) en C-4 presente en la molécula.

En la región de 5.4-3.2 ppm se observa un conjunto de señales las cuales fueron asignadas a los hidrógenos del anillo de glucosa en la posición 7 del núcleo flavonoide.

Cuadro VII.2 Desplazamiento químico de RMN ¹H de la Tilianina.

H	δ (ppm)	INTEGRACIÓN	MULTIPLICIDAD	J (Hz)
H-3	6.96	1H	s	-
H-3' y H-5'	7.12	2H	d	9.0
H-2' y H-6'	8.06	2H	d	9.0
H (OH)	12.91	1H	s	-
H-6	6.45	1H	d	1.8
H-8	6.75	1H	d	1.8
Me-4'	3.85	3H	s	-
H-glucosa	5.4-3.2	11H	m	-

DMSO-d₆, TMS, 200 MHz.

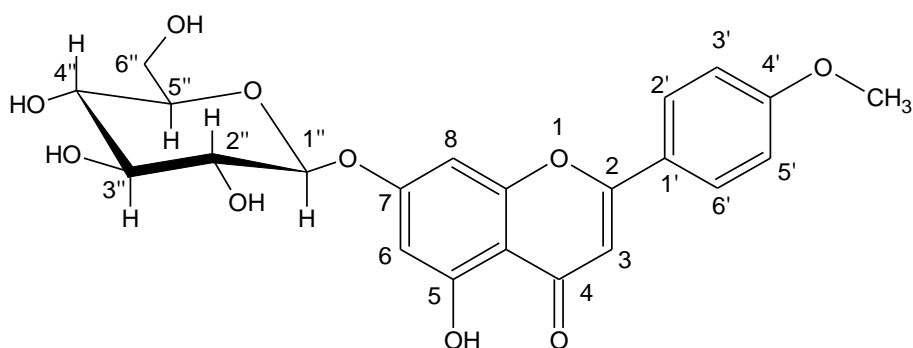


Figura VII.1 Estructura química de la Tilianina.

7.1.3 Elucidación Estructural del (2-acetil)-7-O-β-D-glucopiranosido de la acacetina.

En el espectro de IR del (2-acetil)-7-O-β-D-glucopiranosido de la acacetina (Espectro 3, ANEXO) se observa una banda a 3283 cm⁻¹ correspondiente a un grupo hidroxilo, en 1750 cm⁻¹ una banda característica de un grupo acetato, en 1666 cm⁻¹ una banda típica de carbonilos α-β insaturado y a 1604 cm⁻¹ una banda que corresponde a dobles enlaces.

El espectro de RMN-¹H (Espectro 4) del (2-acetil)-7-O-β-D-glucopiranosido de la acacetina muestra un singulete que integra para 1H a 6.96 ppm que corresponde al H-3 del anillo C del núcleo flavonoide.

A campos bajos se encuentra nuevamente un sistema AA'BB' el cual corresponde a los protones aromáticos H-3' y H-5' en 7.11 ppm ($J = 9.0$ Hz), así como en 8.08 ppm ($J = 9.0$ Hz) los para H-2' y H-6'.

Se observa una señal a δ 6.81 ($J = 2.2$ Hz) designada a H-8 y en δ 6.41 ($J = 2.0$) para el H-6.

Al igual que la tilianina, en la región de 5.5-3.2 ppm se observa un conjunto de señales, las cuales fueron asignadas a los hidrógenos del anillo de glucosa en la posición 7 del núcleo flavonoide. En δ 2.2 se encuentra un singulete que integra para 3H, el cual fue asignado a los protones del grupo acetato de la posición 2'' en el anillo de la glucosa el cual se corroboró por su espectro de IR, concluyéndose que el sólido aislado corresponde a la flavona (2-acetil)-7-O-β-D-glucopiranosido de la acacetina según lo reportado por Estrada-Reyes (2004) ¹.

El Cuadro VII.3 muestran el desplazamiento químico del (2-acetil)-7-O-β-D-glucopiranosido de la acacetina aislado de *A. mexicana* subsp *mexicana*. Figura VII.2.

Cuadro VII.3 Desplazamiento químico de RMN ^1H del (2-acetil)-7-O- β -D-glucopiranosido de la acetina.

H	$\delta(\text{ppm})$	INTEGRACIÓN	MULTIPLICIDAD	J (Hz)
H-3	6.96	1H	s	-
H-3' y H-5'	7.11	2H	d	9.0
H-2' y H-6'	8.08	2H	d	9.0
H (OH)	12.93	1H	s	-
H-6	6.41	2H	d	2.0
H-8	6.81	2H	d	2.2
Me-4'	3.85	3H	s	-
H-glucosa	5.4-3.0	11H	m	-
Me-2''	2.029	3H	s	-

DMSO-d₆, TMS, 200 MHz.

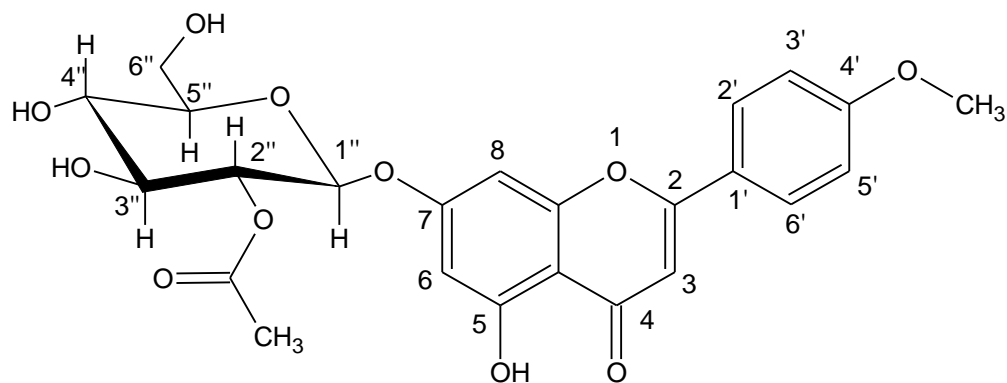


Figura VII.2 Estructura química del (2-acetil)-7-O- β -D-glucopiranosido de la acetina

7.1.4 Análisis por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (CLAR)

El análisis por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (CLAR) del extracto acuoso permitió determinar la presencia de la tilianina y del (2-acetil)-7-O- β -D-glucopiranosido de la acacetina en este extracto. (Cromatograma 1, Anexo). La fase móvil fue una mezcla de disolventes MeOH:H₂O en una proporción inicial 10/90 y final en una proporción 100/0. El tiempo de corrida fue de 50 min a una longitud de onda de 254 nm.

En el Cuadro VII.4 se muestran los resultados obtenidos en el análisis por CLAR de la tilianina y del (2-acetil)-7-O- β -D-glucopiranosido de la acacetina. Para la tilianina (Cromatograma 2) se obtuvo un tiempo de retención de 39.928 min. El glucósido (2-acetil)-7-O- β -D-glucopiranosido de la acacetina presentó un tiempo de retención de 39.934 min (Cromatograma 3). Sin embargo, cuando se co-inyectaron las dos flavonas el tiempo de retención fue de 40.46 min (Cromatograma 4). Este mismo resultado se observó en el análisis del extracto acuoso. Por lo tanto se propone que ambos compuestos están presentes en el extracto acuoso y que poseen el mismo tiempo de retención. Esta propuesta está apoyada por el hecho de que en esta especie se ha logrado el aislamiento de ambas flavonas.

Cuadro VII.4 CLAR del Extracto acuoso y de la tilianina y del (2-acetil)-7-O- β -D-glucopiranosido de la acacetina obtenidos de *A. mexicana* subsp *mexicana*

COMPUESTO	TIEMPO DE RETENCIÓN (min)	% ÁREA
Tilianina	39.928	67.7354
(2-acetil)-7-O- β -D-glucopiranosido de la acacetina	39.934	83.0246

A partir del análisis químico que permitió la preparación e identificación de los compuestos aislados, se procedió a la evaluación de los efectos genotóxicos y citotóxicos del extracto acuoso, así como de la tilianina en sangre periférica de ratón CD1 *in vivo* mediante el ensayo cometa alcalino, micronúcleos y tinción por exclusión con azul tripano respectivamente.

7.2 Estudio Biológico

7.2.1 Evaluación Genotóxica del Extracto Acuoso Mediante el Ensayo con Micronucleos.

El ensayo con micronúcleos *in vivo* ha sido ampliamente usado para detectar genotoxicidad. La evaluación por inducción de micronúcleos es la primera de una serie de pruebas para la evaluación de genotoxicidad y es recomendada por agencias regulatorias alrededor del mundo.²⁷

El extracto acuoso de *A. mexicana* subsp *mexicana* no muestra un efecto genotóxico en el ensayo con micronúcleos al no haber diferencias estadísticamente significativas en eritrocitos policromáticos micronucleados (EPC-MN/1000 eritrocitos) con respecto al tiempo 0 en muestras de sangre periférica de ratón CD1 en las diferentes dosis administradas a los diferentes tiempos de muestreo. Los resultados se muestran en el Cuadro VII.5.

Sin embargo, se observa un incremento en la frecuencia de EPC-MN al aumentar la dosis administrada (efecto dosis dependiente). Así mismo, encontramos un aumento en la frecuencia de EPC-MN en los diferentes tiempos de muestreo a excepción de las 72 h donde empieza a disminuir la frecuencia de micronucleos. El fármaco de referencia (CP) tiene el mismo comportamiento que se observa para el extracto acuoso.

Cuadro VII.5 Efecto del extracto acuoso de *A. mexicana* subsp *mexicana* en la frecuencia de EPC-MN en 1000 eritrocitos policromáticos en sangre periférica de ratón CD1 para la evaluación de genotoxicidad a diferentes dosis.

Tratamiento	Dosis (mg/Kg)	Tiempo de muestreo (h)			
		0	24	48	72
Extracto Acuoso	100	0.6 ± 0.24	0.4 ± 0.40	0.4 ± 0.40	1.0 ± 0.54
	200	0.8 ± 0.37	1.0 ± 0.31	2.4 ± 0.81	1.2 ± 0.58
	1000	0.5 ± 0.28	2.0 ± 0.89	1.0 ± 0.44	0.4 ± 0.24
CP	40	0.2 ± 0.20	1.4 ± 0.74	2.6 ± 0.60*	1.0 ± 0.63

Análisis de Varianza (ANOVA) con $p < 0.05$ y la prueba de comparación Múltiple Newman-Keuls
 Datos representados como Promedio ± EE;
 EE: error estadístico; CP: Ciclofosfamida (testigo positivo)

7.2.2 Evaluación Genotóxica del Extracto Acuoso Mediante el Ensayo Cometa

El ensayo cometa alcalino, es un ensayo molecular sensible, para medir el daño al ADN de cadena doble y/o sencilla a nivel de genoma en células eucariotas. Este ensayo detecta sitios álcali-lábiles, los cuales indican puntos de reparación incompleta del ADN y cambios en las conformaciones cromosómicas estructurales.²⁸ Esta técnica se basa en que el ADN fragmentado adquiere una carga neta que le permite migrar hacia el ánodo de un campo eléctrico y dependiendo del tamaño de los fragmentos sus velocidades serán diferentes, de esta manera se puede observar los núcleos no dañados como un círculo brillante, mientras que las células dañadas forman la figura de un cometa.²⁹

Los resultados de los tratamientos con el extracto acuoso de *A. mexicana* subsp *mexicana* en ratones CD1 administrados IP muestran que a dosis de 100 y 200 mg/Kg (PC) hay un efecto genotóxico evidenciado por el incremento en el promedio de la frecuencia de núcleos con relación al tiempo 0. En dosis de 1000 mg/Kg (PC) se observa una disminución de células con cometa con respecto al tiempo 0.

De acuerdo al análisis estadístico a las 24, 48 y 72 h después de la administración del extracto no hay un efecto genotóxico en dosis de 10 y 1000 mg/Kg (PC) con respecto al tiempo 0, sin embargo en dosis de 100 y 200 mg/Kg es evidente el efecto genotóxico al haber diferencias estadísticamente significativas con respecto al tiempo 0 ($P < 0.001$). Cuadro VII.6

Cuadro VII.6 Frecuencia promedio de núcleos con cometa (%) en sangre periférica de ratón CD1 previa administración intraperitoneal a diferentes dosis del extracto acuoso de *A. mexicana* subsp *mexicana*

Tratamiento	Dosis (mg/Kg)	Tiempo de muestreo (h)			
		0	24	48	72
Sin Tx	-	2 ± 0.50	1 ± 0.00	2 ± 0.00	2 ± 0.00
Extracto Acuoso	100	3 ± 1.10	8 ± 0.00*	14 ± 0.60*	18 ± 0.37*
	200	3 ± 1.20	12 ± 1.60*	24 ± 3.0*	21 ± 1.12*
	1000	4 ± 0.10	9 ± 1.0	11 ± 3.6	9 ± 1.10
CP	40	4 ± 0.53	27 ± 2.83*	35 ± 2.08*	22 ± 2.46*

Análisis de Varianza (ANOVA) con $p < 0.001$ y la prueba de comparación Múltiple Newman-Keuls
 Datos representados como Promedio ± EE;
 EE: error estadístico; CP: Ciclofosfamida (testigo positivo)

La sensibilidad del ensayo con microgeles se puede optimizar modificando los tiempos de des enrollamiento del ADN y de la electroforesis. Las condiciones

para aumentar la sensibilidad en este ensayo pueden variar dependiendo del compuesto de prueba y las células usadas.

La longitud de la cauda del cometa ha sido sugerida para la evaluación del daño al ADN, se ha demostrado que este parámetro es más sensible y puede proporcionar información adicional que ayuda a definir una respuesta positiva cuando la genotoxicidad del compuesto es desconocida. La longitud en la migración del ADN es repetible y no depende del procesamiento de la imagen que pueda variar con el tipo de sistema utilizado. ³⁰

El Cuadro VII.7 muestra los resultados de la longitud promedio (μm) de células con cometa (fragmentación) en la evaluación genotóxica del extracto acuoso en el ensayo cometa alcalino a diferentes dosis y a diferentes tiempos de muestreo.

Estos resultados indican que en todas las dosis hay un incremento significativo ($P < 0.001$) con respecto al Grupo donde no fue administrado ningún tratamiento en cuanto a la fragmentación de células con cometa, este incremento es conforme se aumenta la dosis administrada, siendo mayor la fragmentación a dosis de 1000mg/kg (PC).

Cuadro VII.7 Longitud promedio de la cauda del cometa (μm) de células de sangre periférica de ratón CD1 previa administración del extracto acuoso de *A. mexicana* subsp *mexicana*

Tratamiento	Dosis (mg/Kg)	Tiempo de muestreo (h)			
		0	24	48	72
Sin Tx	-	13.25±1.2	11.80±0.96	13.01±0.96	10.24±1.81
Extracto Acuoso	100	11.72±0.8	27.68±2.80*	37.50±2.87*	35.26±5.4*
	200	13.85±0.7	30.58±2.74*	36.36±3.23*	37.70±4.3*
	1000	13.18±0.1	30.71±2.4*	42.31±3.33*	61.50±5.24*
CP	40	13.76±0.9	31.39±1.67*	49.23±4.27*	36.20±3.64*

Análisis de Varianza (ANOVA) con $p < 0.001$ y la prueba de comparación Múltiple Newman-Keuls
 Datos representados como Promedio \pm EE;
 EE: error estadístico; CP: Ciclofosfamida (testigo positivo)

7.2.3 Evaluación Genotóxica de la Tilianina Mediante el Ensayo con Micronucleos.

La evaluación genotóxica de la tilianina aislada del extracto metanólico de *A. mexicana* subsp *mexicana* mediante el ensayo con micronúcleos (Cuadro VII.8) indica que no hay efecto genotóxico de la tilianina administrada vía IP a ratones CD1, al no haber diferencias estadísticamente significativas en EPC-MN/1000 eritrocitos con respecto al grupo control ($P < 0.05$).

Cuadro VII.8 Frecuencia de eritrocitos EPC-MN en 1000 EPC en sangre periférica de ratón CD1 previa administración de la tilianina aislada de *A. mexicana* subsp *mexicana*

Tratamiento	Dosis (mg/kg)	Tiempo de muestreo (h)			
		0	24	48	72
Vehículo	-	0.8 ± 0.58	0.2 ± 0.20	0.6 ± 0.24	0.8 ± 0.37
Tilianina	20	0.2 ± 0.20	0.6 ± 0.24	0.6 ± 0.24	0.4 ± 0.24
	80	0.6 ± 0.40	0.8 ± 0.37	0.8 ± 0.58	1.4 ± 0.24
	360	0.8 ± 0.37	1.2 ± 0.73	1.0 ± 0.31	0.8 ± 0.37
CP	40	0.2 ± 0.20	1.4 ± 0.74	2.6 ± 0.60*	1.0 ± 0.63

Análisis de Varianza (ANOVA) con $p < 0.05$ y la prueba de comparación Múltiple Newman-Keuls

Datos representados como Promedio ± EE;

EE: error estadístico; CP: Ciclofosfamida (testigo positivo); Vehículo (DMSO 5%+Tween 1%)

7.2.4 Evaluación Genotóxica de la Tilianina Mediante el Ensayo Cometa.

Los resultados de la evaluación genotóxica de la tilianina mediante el ensayo cometa alcalino, indican que es genotóxica a todas las dosis administradas evidenciado al haber un incremento significativo ($P < 0.001$) en la frecuencia de células con daño con respecto al grupo de ratones a los que no se administró ningún tratamiento (Cuadro VII.9). Nuestros resultados indican que a dosis de 20 y 80 mg/Kg (PC) de la tilianina es mayor el daño que a dosis de 320 mg/Kg (PC).

Cuadro VII.9 Frecuencia de células con cometa (%) de la tilianina aislada de *A. mexicana* subsp *mexicana*

Tratamiento	Dosis (mg/kg)	Tiempo de muestreo (h)			
		0	24	48	72
Control	-	2 ± 0.5	2 ± 0.0	2 ± 0.0	2 ± 0.0
Tilianina	20	3 ± 0.5	12 ± 0.8*	46 ± 3.4*	19 ± 4.3*
	80	4 ± 0.5	24 ± 1.2*	36 ± 3.0*	28 ± 2.7*
	320	4 ± 1.0	23 ± 1.9*	36 ± 2.5*	26 ± 2.4*
CP	40	4 ± 0.5	27 ± 2.8*	35 ± 2.1*	22 ± 2.5*
Vehículo	-	3 ± 0.0	3 ± 0.7	4 ± 0.3	3 ± 0.3

Análisis de Varianza (ANOVA) con $p < 0.001$ y la prueba de comparación Múltiple Newman-Keuls

Datos representados como Promedio ± EE;

EE: error estadístico; CP: Ciclofosfamida (testigo positivo); Vehículo (DMSO 5%+Tween 1%)

De acuerdo a la longitud promedio de células con daño, los resultados indican un aumento estadísticamente significativo ($P<0.001$) en las caudas de los cometas (fragmentación del ADN) en todas las dosis administradas de la tilianina en todos los tiempos de muestreo, los resultados se muestran en el Cuadro VII.10

Cuadro VII.10 Longitud promedio de la cauda del cometa (μm) de células de sangre previa administración de la tilianina aislada de *A. mexicana* subsp *mexicana*

Tratamiento	Dosis (mg/Kg)	Tiempo de muestreo (h)			
		0	24	48	72
Sin TX	-	13.25±1.2	11.80±0.96	13.01±0.96	10.24±1.81
Tilianina	20	11.80±0.0	24.85±2.36*	34.56±1.77*	39.96±1.22*
	80	12.03±1.8	33.84±0.65*	35.52±0.48*	37.68±1.90*
	320	12.97±0.2	28.63±1.4*	34.08±1.00*	43.68±2.31*
CP	40	13.76±0.9	31.39±1.67*	49.23±4.27*	36.20±3.64*
Vehículo	-	11.52±0.9	13.43±1.31	10.57±1.98	11.97±1.67

Análisis de Varianza (ANOVA) con $p<0.001$ y la prueba de comparación Múltiple Newman-Keuls

Datos representados como Promedio \pm EE;

EE: error estadístico; CP: Ciclofosfamida (testigo positivo); Vehículo (DMSO 5%+Tween 1%)

Los resultados obtenidos indican que el ensayo cometa alcalino es más sensible en la detección del daño al ADN causado por el Extracto Acuoso y la tilianina, la razón de esto puede ser atribuida en parte por el tipo de daño que causan estos compuestos.

El ensayo cometa requiere de la fragmentación del ADN causado por un agente mutágeno para tomar la forma de un cometa, por el contrario, el ensayo con micronúcleos no solo involucra diferentes mecanismos que resultan en un daño al ADN, también involucra diferentes tipos de células. El ensayo con micronúcleos detecta daño a los precursores de eritrocitos en medula ósea, mientras que el ensayo cometa alcalino incluye solamente linfocitos maduros.

Los micronúcleos son fragmentos de cromosomas que no fueron incorporados hacia algunos de los polos de las células hijas por lo que estos permanecen en las células afectadas.²⁹

La evaluación de la inducción de MN en eritrocitos de sangre periférica, aunque no es tan sensible como el ensayo cometa alcalino, puede indicar daño genotóxico muy alto.

Da Silva explica la baja genotoxicidad de los flavonoides debido a que estos se encuentran en su forma natural como glicosidos y es probable que estos no sean directamente absorbidos. Por lo tanto su absorción depende de la acción de las glicosidasas digestivas.²⁷

Aunado a lo anterior, en los metabolitos secundarios presentes en la dieta hay que considerar su metabolismo. Por ejemplo, la ausencia de genotoxicidad de la quercetina a dosis bajas después de su administración sugiere que esta es rápidamente metabolizada. Esta hipótesis, la cual está de acuerdo con los datos de algunos autores, se basa en que después de ingerir quercetina en un breve periodo de tiempo, las concentraciones plasmáticas vuelven a sus niveles basales.

Sin embargo los aglicones de flavonoides pueden resultar biológicamente activos sin importar el residuo de azúcar que acompaña a los glicósidos. Por ejemplo, el daño al ADN inducido por la quercetina a dosis altas puede ocurrir por más de un mecanismo. Diversos estudios han demostrado la genotoxicidad de esta flavona en varios ensayos a corto plazo sin embargo no hay resultados consistentes en relación a su carcinogénesis. ^{32, 33}

Sahu y Gray (1996) explican que la genotoxicidad de la quercetina es el resultado de la producción de especies reactivas de oxígeno por ciclo redox. La quercetina y otros compuestos polifenólicos dan lugar al anión superóxido por auto-oxidación, que a su vez conduce a la formación de H₂O₂ y subsecuentemente el daño al ADN. ^{34, 35}

De esta forma podemos explicar que tanto el extracto acuoso como la tilianina inducen daño al ADN solo en la prueba Cometa pero no en la de micronúcleos además está el hecho de que al ser metabolizados en el organismo el daño se ve disminuido en los últimos tiempos de muestreo.

7.2.5 Viabilidad Celular del Extracto Acuoso

La viabilidad celular del extracto acuoso en sangre periférica de ratón CD1 indica que el extracto es citotóxico a las dosis de 100, 200 y 1000 mg/Kg de peso corporal evidenciado al haber una diferencia significativa ($P<0.001$) con respecto al grupo que no se administró tratamiento. Los resultados se muestran en el Cuadro VII.11.

Cuadro VII.11 Análisis de viabilidad celular en sangre periférica de ratón CD1 del extracto acuoso de *A. mexicana* subsp *mexicana*

Tratamiento	Dosis (mg/Kg)	Tiempo de muestreo (h)		
		24	48	72
Sin Tx	-	96.00±1.00	96.50±0.55	97.50±0.50
CP	40	86.66±0.88*	90.00±0.57*	96.00±0.57
Extracto Acuoso	100	84.33±1.20*	89.33±1.20*	96.33±0.66
	200	86.00±1.15*	89.66±0.88*	96.33±0.66
	1000	88.60±0.88*	89.00±0.57*	96.33±0.33

Análisis de Varianza (ANOVA) con $p<0.001$ y la prueba de comparación Múltiple Newman-Keuls
 Datos representados como Promedio ± EE;
 EE: error estadístico; CP: Ciclofosfamida (testigo positivo)

7.2.6 Viabilidad Celular de la Tilianina

Los resultados en el ensayo de viabilidad con azul de tripano indican que el la tilianina administrada a diferentes dosis es citotóxica al haber una diferencia significativa ($P < 0.001$) con respecto al grupo donde no se administró ningún tratamiento como se observa en el Cuadro VII.11

Cuadro VII.12 Análisis de viabilidad celular en sangre periférica de ratón CD1 de la tilianina aislada de *A. mexicana* subsp *mexicana*

Tratamiento	Dosis (mg/Kg)	Tiempo de muestreo (h)		
		24	48	72
Control	-	96.00±1.00	96.50±0.55	97.50±0.50
Vehículo	-	87.66±1.20	90.66±0.66	97.33±0.33
CP	40	86.66±0.88*	90.00±0.57*	96.00±0.57
Tilianina	20	82.00±1.58*	89.00±0.44*	97.60±1.40
	80	84.60±1.20*	90.20±0.37*	96.00±0.31
	320	85.40±0.74*	91.00±0.33*	96.66±0.50

Análisis de Varianza (ANOVA) con $p < 0.001$ y la prueba de comparación Múltiple Newman-Keuls
 Datos representados como Promedio ± EE;
 EE: error estadístico; CP: Ciclofosfamida (testigo positivo); Vehículo (DMSO 5%+Tween 1%)

Estos datos indican que hay un efecto en la viabilidad celular del extracto acuoso y de la tilianina en sangre periférica de ratones CD1 al haber una diferencia estadísticamente significativa con respecto al grupo control, sin embargo, el porcentaje de células vivas es muy alto para poder considerar ambos compuestos citotóxicos.

Esto concuerda con el estudio realizado en 2009 por nuestro grupo de trabajo donde se reportó la baja citotoxicidad de la tilianina y el (2-acetil)-7-O- β -D-glucopiranosido de la acacetina en diferentes líneas de cáncer humano y su poca probabilidad de ser utilizados como agentes citotóxicos. La tilianina mostró a una dosis de 50 μ M una inhibición de proliferación de 56.17 % y 64.71 % para las líneas de sistema nervioso central (U-251) y próstata (PC-3) respectivamente. Por otro lado, el (2-acetil)-7-O- β -D-glucopiranosido de la acacetina mostró un decremento notable en sus propiedades citotóxicas, observándose como el mayor valor de inhibición solamente 39.24 % en la línea de próstata.

A pesar de que estos resultados son de pruebas *in vitro*, no deja de llamar la atención que la presencia de un solo residuo de acetato en la posición 2 de la glucosa en el (2-acetil)-7-O- β -D-glucopiranosido de la acacetina, en contraste con la tilianina, es determinante para que el derivado acetilado disminuya su inhibición de proliferación de las líneas de cáncer humano ensayadas comparada con la tilianina. ⁴

Adicionalmente se realizó la evaluación de la inhibición de la proliferación celular del extracto acuoso de *A. mexicana* subsp *mexicana* mediante el método de sulforrodamina B utilizando como fármaco de referencia el cisplatino en diferentes células de cáncer humano.

De acuerdo a los resultados que se muestran en el Cuadro VII.13, el extracto acuoso manifiesta una mayor capacidad citotóxica en las líneas celulares de cáncer humano HCT-15 y MCF-7, con un porcentaje de inhibición de proliferación de 51.1% y 36.0% respectivamente, sin embargo no es lo

suficientemente citotóxico para poder ser utilizado como un posible agente anticanceroso.

Cuadro VII.13 Porcentaje de inhibición de la proliferación celular del extracto acuoso de *Agastache mexicana* subsp *mexicana* a una concentración de 50 µg/mL en DMSO

	U251	PC-3	HCT-15	MCF-7	SKLU-1
Extracto acuoso	10.79	6.52	51.1	36.0	15.27

U251= glia de SNC, PC-3= próstata, HCT-15= colón, MCF-7= mama, SKLU-1= adenocarcinoma de pulmón.

VIII. CONCLUSIONES

Con base en los resultados obtenidos se puede concluir lo siguiente:

- ◆ A partir del extracto de metanol de la especie *A. mexicana* subsp *mexicana* se logró el aislamiento de las flavonas 7-O-β-D glucopiranosido de acacetina (tilianina) y el 7-O-β-D-(2-acetil) glucopiranosido de acacetina.
- ◆ La identificación estructural de ambas flavonas se logró mediante la comparación de sus datos físicos y espectroscópicos con los informados en la literatura.
- ◆ Se logró la obtención del Extracto Acuoso liofilizado.
- ◆ Mediante CLAR se determinó la presencia del 7-O-β-D glucopiranosido de la acacetina (tilianina) y el 7-O-β-D-(2-acetil) glucopiranosido de la acacetina en el extracto acuoso de la especie *A. mexicana* subsp *mexicana*.
- ◆ De acuerdo a los objetivos se realizó la evaluación genotóxica y citotóxica *in vivo* mediante el ensayo cometa alcalino y el ensayo con micronúcleos del extracto acuoso así como del 7-O-β-D glucopiranosido de la acacetina (tilianina).
- ◆ El ensayo cometa indica que tanto el extracto acuoso como el 7-O-β-D glucopiranosido de la acacetina (tilianina) son genotóxicos al inducir daño al ADN observado por la frecuencia de células con cometa y la longitud de sus caudas.
- ◆ Los resultados en el ensayo con micronúcleos muestran que tanto el extracto acuoso como el 7-O-β-D glucopiranosido de acacetina (tilianina) no causan daño a nivel cromosómico a las dosis evaluadas en los diferentes tiempos de muestreo.

- ◆ La viabilidad en sangre periférica de ratón CD1 administrados IP a diferentes dosis con el extracto acuoso y el 7-O- β -D glucopiranosido de acetina (tilianina) muestra una disminución significativa hasta ocasionar muerte celular.
- ◆ La evaluación de la inhibición de la proliferación celular del extracto acuoso de *A. mexicana* subsp *mexicana* mostró una mayor capacidad citotóxica en las líneas celulares de cáncer humano HCT-15 y MCF-7.
- ◆ Los resultados obtenidos confirman la hipótesis planteada al demostrar que el 7-O- β -D glucopiranosido de la acetina (tilianina), aislada de *A. mexicana* subsp *mexicana* así como el extracto acuoso no presentan actividades citotóxicas y genotóxicas, dichos resultados nos hacen suponer que existe un mecanismo de reparación de daño oxidativo en el ADN por lo tanto el daño es reversible.

IX. BIBLIOGRAFÍA

- [1] Estrada R, Aguirre H, García A, Soto H, Linares M, Bye R, Heinze G, Martínez V. "Comparative Chemical composition of *Agastache mexicana* subsp. *mexicana* and *A. mexicana* subsp. *Xolocotizana*", *Bio. System. and Eco.* 32, **2004**. p. 685 – 694.
- [2] Santillan R, López B, Aguilar S, Aguilar C. "Estudio Etnobotánico Ararquitectura Foliar y Anatomía Vegetativa de *Agastache Mexicana* ssp *mexicana* y *A. mexicana* ssp *xolocotziana*". *Rev. Mex. de Biodiv.* 79, **2008**. p. 513-524.
- [3] *Biblioteca digital de la Medicina Tradicional Mexicana. Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana* [en línea]. México. **2009**. <http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/atlas.php?mo=moe>
- [4] Cuevas Cervantes, Paola. *Aislamiento, transformaciones químicas y determinación de la actividad citotóxica, antiinflamatoria y producción de óxido nítrico de flavonoides bioactivos a partir de A. Mexicana subsp mexicana*. **2009**. (Tesis de Licenciatura en QFB. Universidad Simón Bolívar).
- [5] Araujo Escalona, Ana. *Evaluación del efecto sedante de la 7-O-glucosilacetina en modelos animales de conducta y su posible interacción con el sistema GABAérgico*. **2009**. (Tesis de Licenciatura en Biología. FES Zaragoza, UNAM).
- [6] Estrada Reyes, Rosa. *Estudio Fitoquímico y evaluación Neurofarmacológica de los "toronjiles", Clinopodium mexicanum, Dracocephalum moldavica y Agastache mexicana subesp. mexicana y subesp. xolocotziana, utilizados en la medicina tradicional Mexicana como tranquilizantes*. **2015**. (Tesis de Doctorado. Posgrado en Ciencias Biomédicas, UNAM).

- [7] Fraga C. "Plant Polyphenols: How to translate their in vitro Antioxidant actions to in vivo Conditions". *IUBMB Life*. 59, **2007**. p. 308-315.
- [8] Middleton E, Kandaswami C, Theoharides T. "The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease and cancer". *Pharma. Rev.* 52, **2000**. p. 673-751.
- [9] Andrei I, Igor A, Nina G, Liliya N, Mark T. "Improved quantitative structure-activity of flavonoids in chemical, enzymatic and cellular systems". *Bioorg. & Med. Chem.* 15, **2007**. p. 1749-1770.
- [10] Jae H, Jee Y, Yong T, Joung G, Yong J. "Effects of low dose Quercetin: Cancer Cell-Specific Inhibition of Cell Cycle Progression". *Jour. of Cel. Biochem.* 106, **2009**. p. 73-82.
- [11] Hernández A, Castillo E, León R, Ibarra B, Villalobos M, González C, Vergara G, Estrada S. "Antihypertensive and vasorelaxant effects of tilianin isolated from *Agastache mexicana* are mediated by NO/cGMP pathway and potassium channel opening". *Biochem. Pharmac.* 78, **2009**. p. 54-61.
- [12] Mittal R, Patil P, Torgal S. "Screening of codeine, dextromethorphan & dextropropoxyphene for their genotoxicity in swiss albino mice". *Indian J. Med. Res.* 129, **2009**. p. 676-680.
- [13] Bhimanagouda S, Jayaprakasha G, Chidambara K. "Bioactive Compounds: Historical Perspectives, Opportunities and Challenges". *Agric. Food Chem.* 18, **2009**. p. 8142-60.
- [14] Tice R, Agurell E, Anderson D, Burlinson B, Hartmann A., Kobayashi H, Miyamahe Y, Ryu R, Sasaki I. "Single Cell/Comet Assay: Guidelines for in vitro and in vivo Genetic Toxicology Testing". *Enviro. and Molec. Mutag.* 35, **2000**. p. 206-221.

- [15] Rosas A, Domínguez R, Díaz B, Soto H, Martínez V, Valencia G. "Effect of 6-nonadecyl salicylic acid and its methyl ester on the induction of micronuclei in polychromatic erythrocytes in mouse peripheral blood". *Mut. Res.* 609, **2006**. p. 43-46.
- [16] Fairbairn W, Olive P, O'Neill K. "The comet assay: a comprehensive review". *Mut. Res.* 339, **1995**. p. 37-45.
- [17] Krishna G, Urda G, Theiss J. "Comparative Mouse Micronucleus Evaluation in Bone Marrow and Spleen Using Immunofluorescence and Wright's Giemsa". *Mut. Res.* 323, **1994**. p. 11-20.
- [18] Altman S, Randers L, Rao G. "Comparison of trypan blue dye exclusion and fluorometric assays for mammalian cell viability determinations". *Biotech. Prog.* 9, **1993**. p. 671-674.
- [19] Mejía Flores, Marcela. Evaluación genotóxica de extractos y compuestos obtenidos de *Verbesina persicifolia* DC. 2010. (Tesis de maestría en ciencias biológicas. Facultad de Ciencias, UNAM.
- [20] Krishna G, Urda G, Paulissen J. "Historical vehicle and Positive Control Micronucleus data in Mice and Rats". *Mut. Res.* 453, **2000**. p. 45-50.
- [21] Moller P. "The Alkaline Comet Assay: Towards Validation in Biomonitoring of DNA Damaging Exposures". *Bas. Clinic. Pharma. & Toxic.* 98, **2006**. p. 336-345.
- [22] Olive P, Banáth J. "The Comet Assay: Method to Measure DNA Damage in Individual Cells". *Nat. Protoc.* 1, **2006**. p. 23-9.
- [23] Rojas E, López M, Valverde M. "Single Cell Electrophoresis Assay: Methodology and Applications". *Jour. of Chromatog. B.* 722, **1999**. p. 225-254.

- [24] Gopala K, Makoto H. "In vivo rodent micronucleus assay: protocol, conduct and data interpretation". *Mut. Res.* 455, **2000**. p. 155–166.
- [25] Hayashi M, Sofuni T, Ishidate M. "An Application of Acridine Orange Fluorescent Staining to the Micronucleus Test". *Mut. Res.* 120, **1983**. p. 214-247.
- [26] Springer- Velarg. "Methods in Human Cytogenetics". H.G. Schwarzacher and U. Wolf, **1974**. p. 83-94.
- [27] Da Silva J, Herrmann S, Heuser V, Peres W, Possa N, Gonzalez J, Erdtmann B. "Evaluation of Genotoxic Effect of Rutin and Quercetin by Comet Assay and Micronucleus Test". *Food Chem. Toxic.* 40, **2002**. p. 941-947.
- [28] Mark S, Elizabeth D, Michael J. "The Comet Assay: Genotoxic Damage or Nuclear Fragmentation?" *Env. Molec. Mut.* 42, **2003**. p. 61-67.
- [29] Maria V, Michael L. "Comparison of Alkaline Single Cell Gel (Comet) and Peripheral Blood Micronucleus Assay in Detecting DNA Damage Caused by Direct and Indirect Acting Mutagens". *Mut. Res.* 381, **1997**. p. 31-40.
- [30] Montheith D, Vanstone J. "Comparison of the Microgel Electrophoresis Assay and Other Assays for Genotoxicity in the Detection of DNA Damage". *Mut. Res.* 345, **1995**. p. 97-103.
- [31] Flores Ramírez, Diana. *Evaluación Genotóxica de los Insecticidas Bulldock 125 Sc Y Calypso 480 Sc en Linfocitos Periféricos Humanos In Vitro, Mediante el Ensayo Cometa Alcalino*. **2009**. (Tesis de Licenciatura en Biología, Facultad de Ciencias UNAM).
- [32] Crebelli R, Aquilla E, Falcone A, Carere A. "Urinary and Faecal Mutagenicity in Sprague-Dawley rats dosed with the food Mutagens Quercetin and Rutin". *Food Chem. Toxic.* 25, **1987**. p. 9-15.

- [33] Rueff J, Laires A, Gaspar J, Borba H, Rodrigues A. "Oxygen Species and the Genotoxicity of Quercetin". *Mut. Res.* 265, **1992**. p. 75-81.
- [34] Sotoewsand G, Anderson L, Boyd J, Hrazdina G. "Quercetin: A Mutagen not a Carcinogen, in Fisher Rats". *Jour. of Toxic. En. Health.* 14, **1984**. p. 105-114.
- [35] Gaspar J, Laires A, Monteiro M. "Quercitin and the Mutagenicity of Wines". *Mutage.* 8, **1993**. p. 51-55.
- [36] Anderson D, Yu T, Philips B, Schmezer P. "The Effect of Varius Antioxidants and Other Modifying Agents on Oxygen-Radical-Generated DNA Damage in Human Lymphocytes in the COMET Assay". *Mut. Res.* 307, **1994**. p. 261-271.
- [37] FHEUM. *Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos*. Secretaría de Salud, México DF **2001**. p. 228.
- [38] Linares E, Flores B, Bye R. *Plantas Medicinales de México: Usos y remedios Tradicionales*, 2nd ed. Centro de Tecnología Electrónica e Informática (CETEI) y el instituto de Biología de la Universidad Nacional Autónoma de México (IB-UNAM), **1995** México.
- [39] Xiaoqin H, Tong L, Jiande G, Xiaomin L. "3D-QSAR Model of flavonoids binding benzodiazepine site in GABA receptors". *J. Med. Chem.* 44, **2001**. p. 1883-1891.
- [40] Hernández, F. *Historia Natural de la Nueva España*. Vol I. Universidad Nacional Autónoma de México. México D.F. **1959**. p. 87.
- [41] Martínez, M. *Las plantas medicinales de México*. Botas. México. **1969**. p. 628.
- [42] Volker M, Fekadu K, Sonja B, Wen QL, Robert W, Rosa S, Hubertus E, Mahmoud A, Samir A, Thorsten S. "*Extract of Toxicodendron quercifolium*

- caused genotoxicity and antigenotoxicity in bone marrow cells of CD1 mice*".
Food and Chem. Toxic. 42, **2004**. p. 1611–1617.
- [43] Castro L, Perazzo F, Maistro E. "Genotoxicity testing of *Ambelania occidentalis* (Apocynaceae) leaf extract in vivo". *Gen. Mol.* 8, **2009**. p. 440-447.
- [44] Anwarul H, Atta R. "Perspective paper: Trends in Ethnopharmacology". *J. Eth. Pharm.* 100, **2005**. p. 43-49.
- [45] Byung S, Myung H, Hyun J. "Statistical Analysis of In vivo Rodent Micronucleus Assay". *Mut. Res.* 469, **2000**. p. 233-241.
- [46] Popoca J, Aguilar A, Alonso D, Villareal ML. "Citotoxic Activity of Selected Plants Used as Antitumorals in Mexican Traditional Medicine". *J. Ethno. Pharm.* 59, **1998**. p. 173-177.
- [47] Arenciba D, Rosario L. "Actualización Sobre el Ensayo Cometa y de Micronúcleos In Vitro". *Rev. Tox.* **2009**. p. 24-42
- [48] Peron A, Mariucci R. "Evaluation of the cytotoxicity, mutagenicity and antimutagenicity of a natural antidepressant, *Hypericum perforatum* L. (St. John's wort), on vegetal and animal test systems". *BMC Comp. Alt. Med.* 13, **2013**. p. 1472-1480.
- [49] Snyder R, Gillies P. "Evaluation of the Clastogenic, DNA Intercalative, and Topoisomerase II-Interactive Properties of Bioflavonoids in Chinese Hamster V79 Cells". *Enviro. Mol. Mut.* 40, **2002**. p. 266-276.

X. LISTA DE ABREVIATURAS

IP	Intraperitoneal
MN	Micronúcleos
EPC	Eritrocitos policromáticos
EPC-MN	Eritrocitos policromáticos micronucleados
SNC	Sistema Nervioso Central
ROS	Especies reactivas de oxígeno
PKC	Enzima proteín cinasa C
NO	Óxido nítrico
μM	Micromolar
mg	Miligramos
Kg	kilogramos
ENC	Eritrocitos normocromáticos
CMN	Células mononucleares
CCF	Cromatografía en capa fina
CC	Cromatografía en columna
N	Normalidad
EDTA	Ácido etilendiamiltetraacético
DMSO	Dimetilsulfoxido
UV	Ultravioleta
IR	Infrarrojo
RMN- ^1H	Resonancia Magnética Nuclear de ^1H
RMN- ^{13}C	Resonancia Magnética Nuclear de ^{13}C
CLAR	Cromatografía Líquida de Alta Resolución
AcOEt	Acetato de etilo
MeOH	Metanol
Hx	Hexano
g	Gramos

mL	Mililitros
h	Horas
SA	Sólido amorfo
Tx	Tratamiento
CP	Ciclofosfamida
μL	Microlitros
NaCl	Cloruro de sodio
M	Molaridad
NaOH	Hidróxido de sodio
Pf	Punto de fusión
°C	Grados centígrados
ppm	Partes por millón
δ	Desplazamiento químico
TMS	Tetrametilsilano
MHz	Megahertz
H ₂ O	Agua Destilada
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrógeno

XI. INDICE DE FIGURAS

Figura II.1	Flores de <i>A. mexicana</i> subsp <i>mexicana</i>	4
Figura II.2	Principales tipos de Flavonoides	8
Figura II.3	Estructura química del kaempferol y quercetina, flavonoides con actividad biológica	9
Figura II.4	Estructura química del 7-O-β-D-glucopiranosido de la acacetina (tilianina)	11
Figura II.5	Células con daño al ADN mediante la técnica Cometa	13
Figura II.6	Mecanismo de formación de micronúcleos en eritrocitos policromáticos (EPC) y normocromáticos (ENC)	15
Figura II.7	Viabilidad celular	16
Figura VI.1	Partes aéreas de <i>A. mexicana</i> subsp <i>mexicana</i>	26
Figura VI.2	Evaporación de disolventes	28
Figura VI.3	Aislamiento de los metabolitos secundarios de <i>A. mexicana</i> subsp <i>mexicana</i>	29
Figura VI.4	Identificación de ratones CD1 por grupos	31
Figura VI.5	Administración del extracto acuoso y de la tilianina	33
Figura VI.6	Muestras de sangre periférica de ratón CD1	33
Figura VI.7	Daño al ADN (fragmentación) en sangre periférica de ratón CD1 inducido por el extracto acuoso de <i>A. mexicana</i> subsp <i>mexicana</i>	35
Figura VI.8	MN/EPC en sangre periférica de ratón CD1	36

Figura VI.9	Viabilidad celular en sangre periférica de ratón CD1	37
Figura VII.1	Estructura química de la Tilianina	40
Figura VII.2	Estructura química del (2-acetil)-7-O- β -D-glucopiranosido de la acetina	42

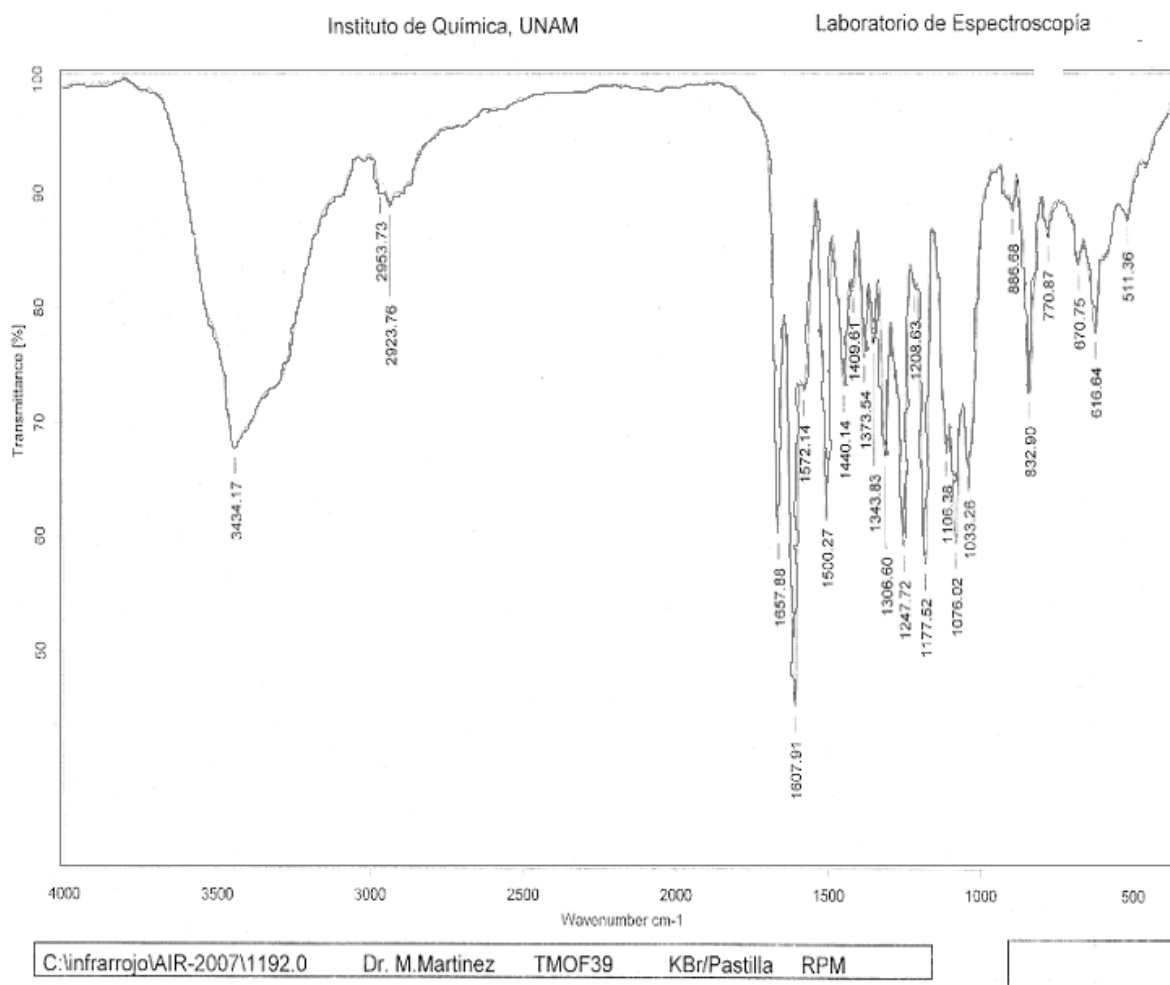
XII. INDICE DE CUADROS

Cuadro II.1	Composición química de <i>A. mexicana</i> subsp <i>mexicana</i> .	6
Cuadro VI.1	Fraccionamiento de la CC del extracto de metanol de la especie <i>A. mexicana</i> subsp <i>mexicana</i> .	28
Cuadro VI.2	Esquema de dosificación y agrupamiento de ratones CD1 para cada tratamiento	32
Cuadro VII.1	Compuestos aislados de <i>A. mexicana</i> subsp <i>mexicana</i> . Rendimientos y puntos de fusión	39
Cuadro VII.2	Desplazamiento químico de RMN ¹ H de la Tilianina	40
Cuadro VII.3	Desplazamiento químico de RMN ¹ H del (2-acetil)-7-O-β-D-glucopiranosido de la acetina	42
Cuadro VII.4	CLAR del Extracto acuoso y de la Tilianina y del (2-acetil)-7-O-β-D-glucopiranosido de la acetina obtenidos de <i>A. mexicana</i> subsp <i>mexicana</i>	43
Cuadro VII.5	Efecto del extracto acuoso de <i>A. mexicana</i> subsp <i>mexicana</i> en la frecuencia de EPC-MN en 1000 eritrocitos policromáticos en sangre periférica de ratón CD1 para la evaluación de genotoxicidad a diferentes dosis	45
Cuadro VII.6	Frecuencia promedio de núcleos con cometa (%) en sangre periférica de ratón CD1 previa administración intraperitoneal a diferentes dosis del extracto acuoso de <i>A. mexicana</i> subsp <i>mexicana</i>	46
Cuadro VII.7	Longitud promedio de la cauda del cometa (μm) de células de sangre periférica de ratón CD1 previa administración del extracto acuoso de <i>A. mexicana</i> subsp <i>mexicana</i>	48
Cuadro VII.8	Frecuencia de eritrocitos EPC-MN en 1000 EPC en sangre periférica de ratón CD1 previa administración de la tilianina aislada de <i>A. mexicana</i> subsp <i>mexicana</i>	49
Cuadro VII.9	Frecuencia de células con cometa (%) de la tilianina aislada de <i>A. mexicana</i> subsp <i>mexicana</i>	50
Cuadro VII.10	Longitud promedio de la cauda del cometa (μm) de células de sangre previa administración de la tilianina aislada de <i>A. mexicana</i> subsp <i>mexicana</i>	51

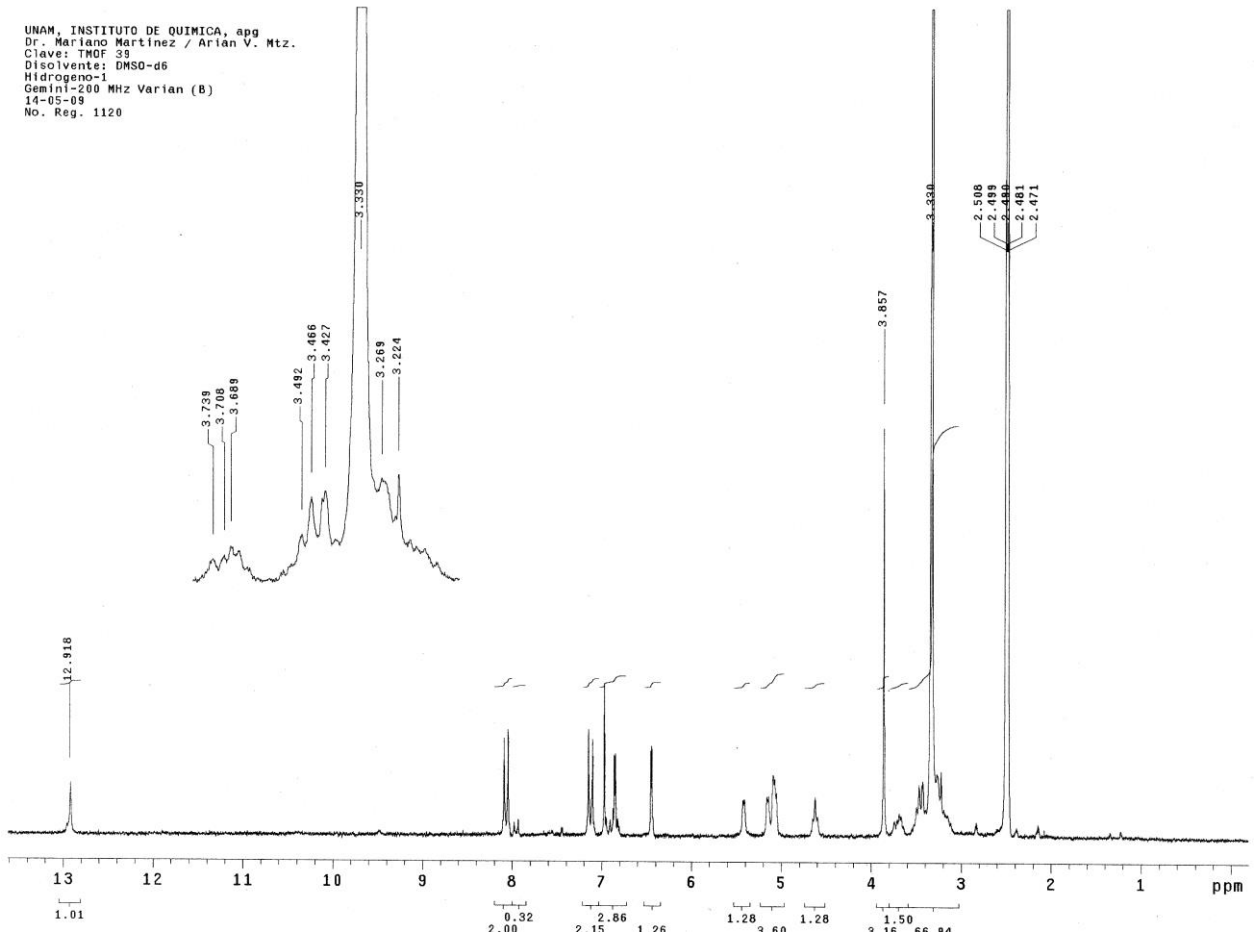
Cuadro VII.11	Análisis de viabilidad celular en sangre periférica de ratón CD1 de la tilianina aislada de <i>A. mexicana</i> subsp <i>mexicana</i>	54
Cuadro VII.12	Análisis de viabilidad celular en sangre periférica de ratón CD1 de la tilianina aislado de <i>A. mexicana</i> subsp <i>mexicana</i>	55
Cuadro VII.13	Porcentaje de inhibición de la proliferación celular del extracto acuoso de <i>Agastache mexicana</i> subsp <i>mexicana</i> a una concentración de 50 µg/mL en DMSO	57

XIII. ANEXO

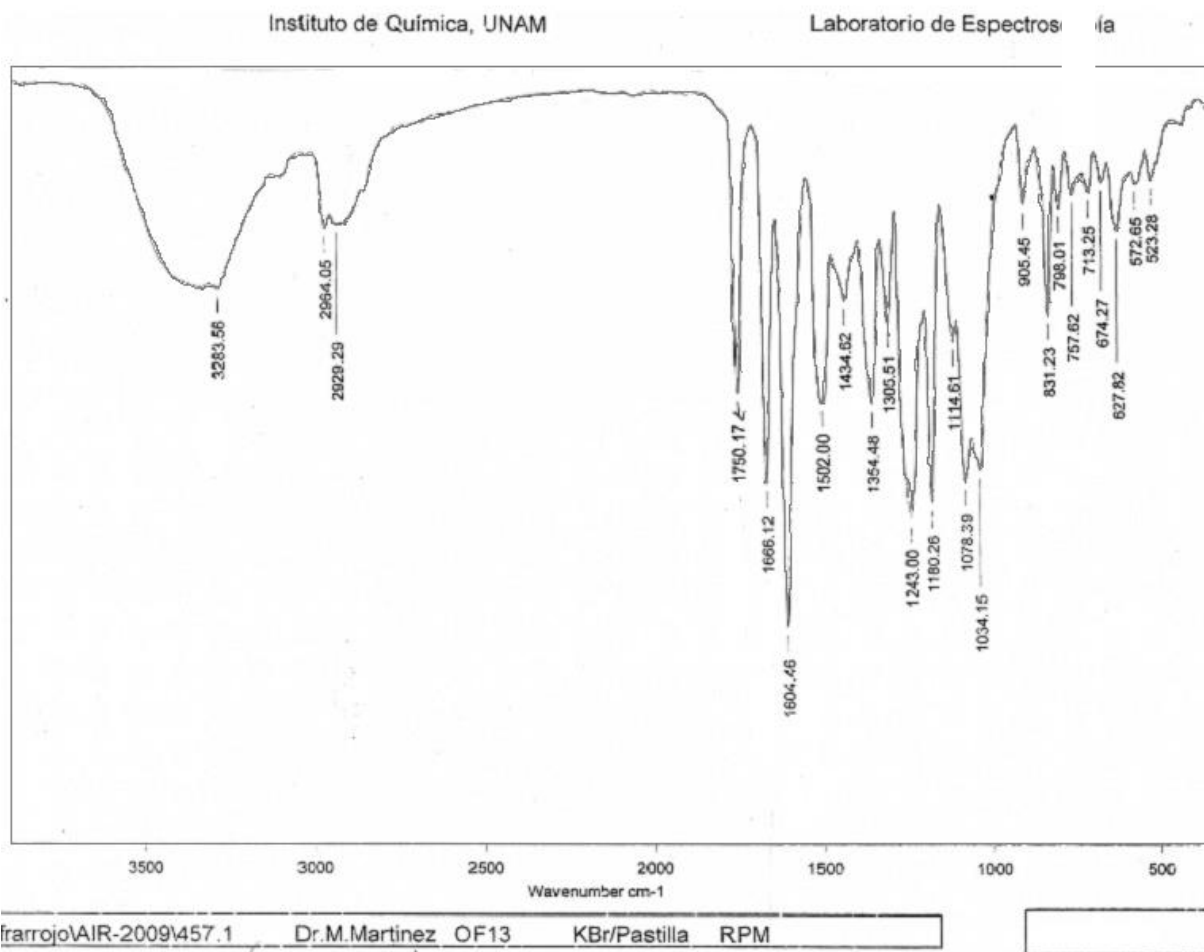
Espectro1. IR de la Tilianina



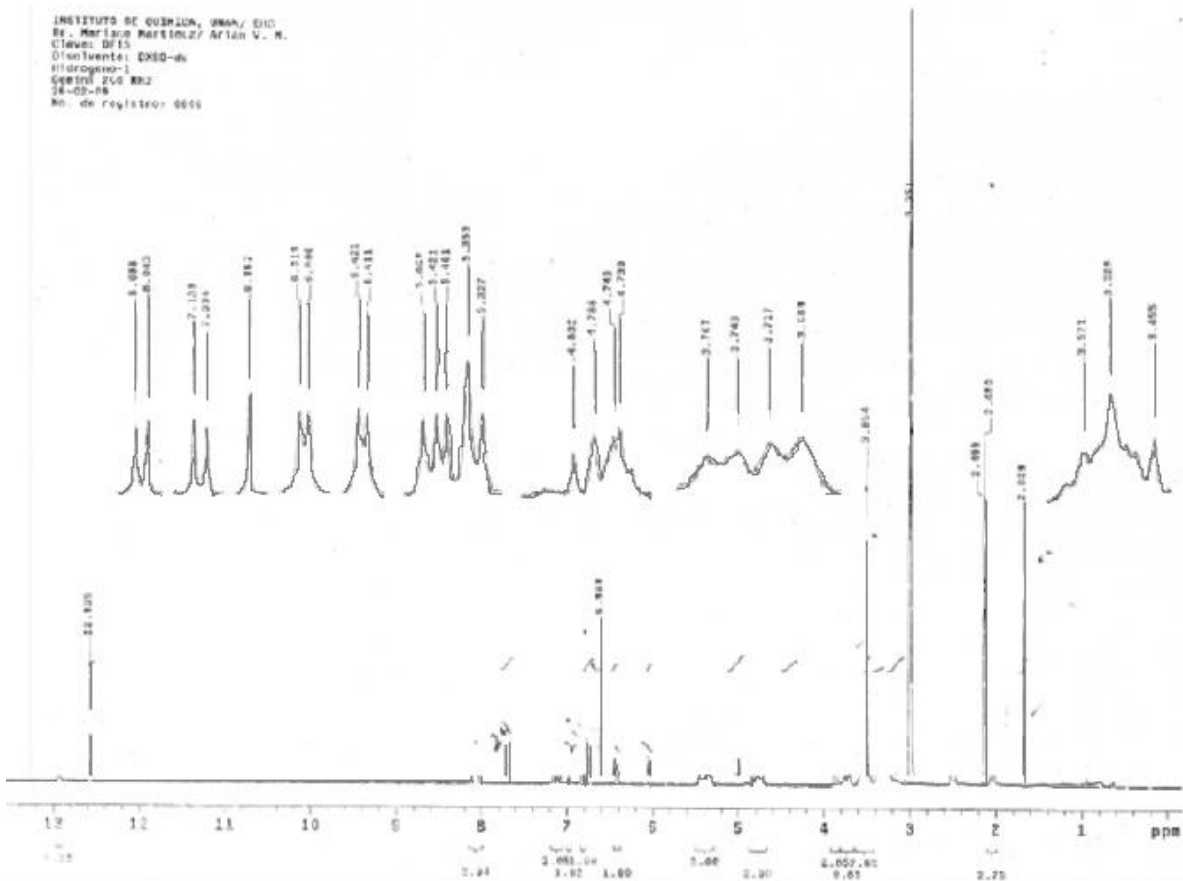
Espectro 2. RMN-¹H de la Tilianina.



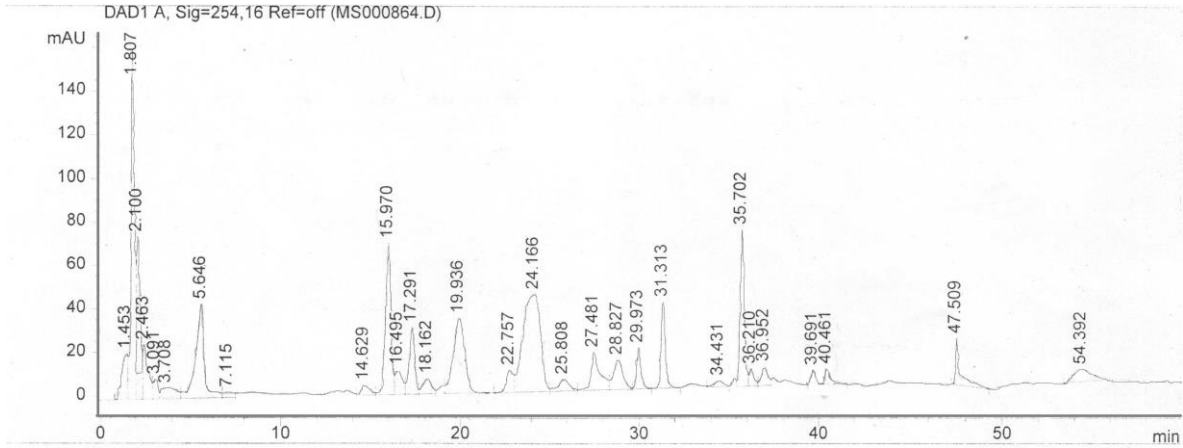
Espectro 3. IR del (2-acetil)- 7-O- β -D-glucopiranosido de la acetina.



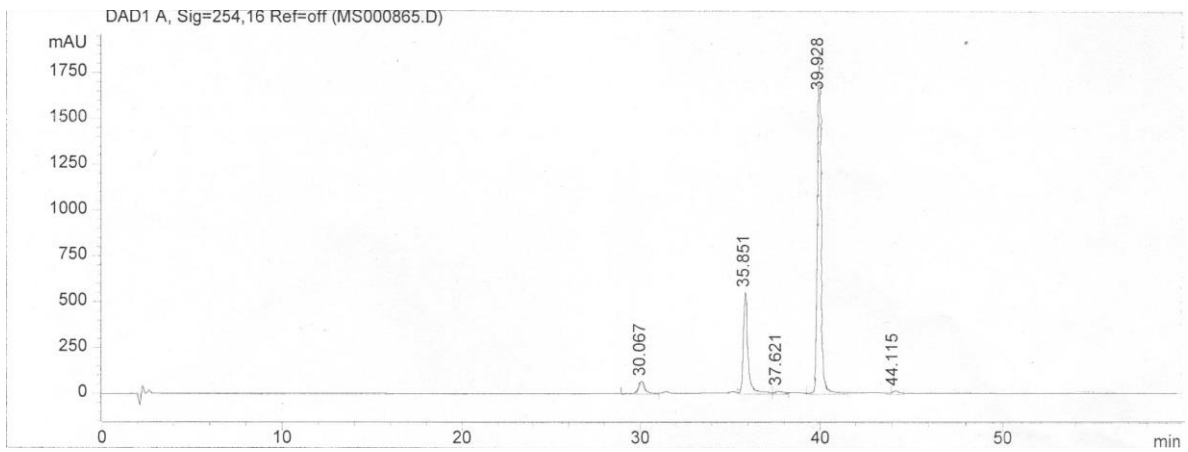
Espectro 4. RMN-¹H del (2-acetil)- 7-O-β-D-glucopiranosido de la acetina.



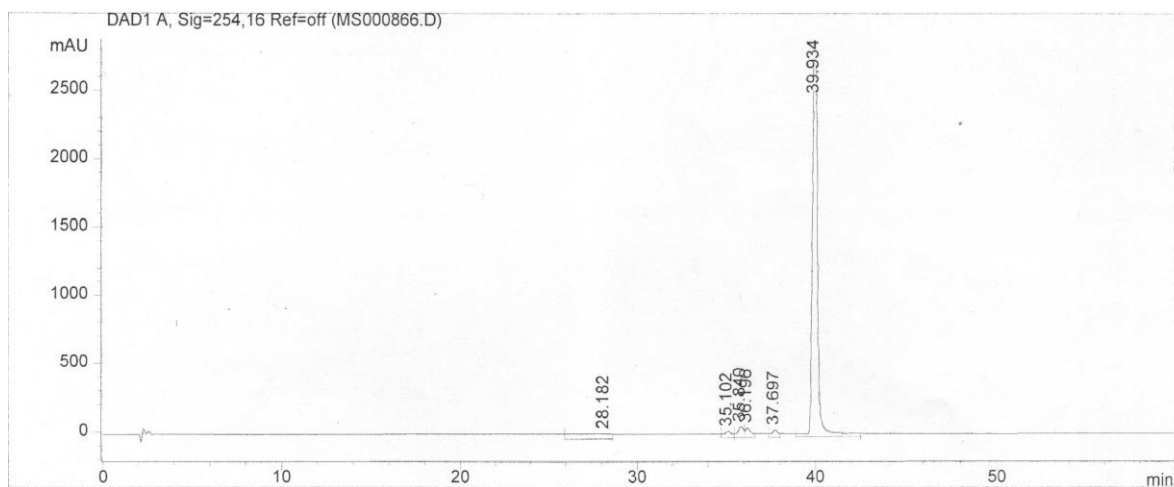
Cromatograma 1. CLAR del Extracto Acuoso.



Cromatograma 2. CLAR de la Tilianina



Cromatograma 3. CLAR del (2-acetil)-7-O- β -D-glucopiranosido de la acetina



Cromatograma 4. CLAR de la Tilianina y el (2-acetil)- 7-O- β -D-glucopiranosido de la acetina

