



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
CUAUTITLAN

ACTIVIDAD GENOTOXICA DEL ACIDO 6-NONADECIL  
SALICILICO AISLADO DE LA CORTEZA DE CUACHALALATE  
Y DE SU ESTER METILICO EVALUADA EN SANGRE  
PERIFERICA DE RATONES CD1 CON LA PRUEBA DE  
MICRONUCLEOS.

**T E S I S**

PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICO FARMACEUTICO BILOGO

P R E S E N T A

**MARITERE DOMINGUEZ ROJAS**

ASESORES: DRA. SANDRA DIAZ BARRIGA ARCEO  
M. EN C. HORTENSIA ROSAS ACEVEDO

CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEXICO

2005

m344942



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL  
SISTEMA DE  
MÉXICO

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

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS



DEPARTAMENTO DE  
EXÁMENES PROFESIONALES

DR. JUAN ANTONIO MONTARAZ CRESPO  
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN  
PRESENTE

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

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

Actividad genotóxica del ácido 6-nonadecil salicílico aislado  
de la corteza de cuachalalate y de su éster metílico evaluada  
en sangre periférica de ratones CD1 con la prueba de micronúcleos

que presenta la pasante: Maritere Domínguez Rojas  
con número de cuenta: 40001044-5 para obtener el título de:  
Química Farmacéutica Bióloga

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

ATENTAMENTE  
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 04 de Marzo de 2005

PRESIDENTE	QFB. Ma. Esther Revuelta Miranda	
VOCAL	Dra. Sandra Díaz Barriga Arceo	
SECRETARIO	QFB. Rosalba Bonilla Sánchez	
PRIMER SUPLENTE	QFI. Guadalupe Koizumi Castro	
SEGUNDO SUPLENTE	MC. Rosa Isela Alvarez González	



El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Citogenética L521 de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, bajo la dirección de la Dra. Sandra Díaz Barriga Arceo y la M. en C. Hortensia Rosas Acevedo.

## AGRADECIMIENTOS

A Dios por ser mi guía y haberme permitido llegar hasta este momento

Agradezco a la Universidad Nacional Autónoma de México por darme la oportunidad de formarme profesionalmente

A la Dra. Sandra Díaz Barriga Arceo por haberme permitido formar parte de su grupo de trabajo, por tenerme confianza, por todos los consejos y el tiempo dedicado a este trabajo, por su orientación tanto profesional como personal y por introducirme al maravilloso mundo de la genética

A la M en C Hortesia Rosas Acevedo por su infinito apoyo, dedicación, tiempo y consejos para la realización de este trabajo pero sobre todo por darme la oportunidad de conocerla y brindarme su amistad

A la QFB Rosalba Bonilla por el tiempo dedicado a leer y corregir esta tesis, por brindarme su amistad durante todo este tiempo y por ser una excelente profesora

A la Dra. Isela por leer y corregir esta tesis, así como sus valiosos comentarios para su mejora

A la QFB Maria Esther Revuelta y a la QFI Guadalupe Koizumi por las atenciones y el tiempo dedicado para la mejora de este trabajo

A las QFB Laura, Sara y al Técnico Pablo por todo su apoyo para la realización de este trabajo y por brindarme su amistad en este tiempo.

A mis compañeros del laboratorio L521, a Maritza por brindarme su valiosa amistad, a Héctor por su tiempo dedicado en la toma de fotografías así como su amistad, a Elvira, Liza, Ale por todos aquellos momentos que crearon un ambiente de armonía en este laboratorio.

A mis amigas de toda la carrera Paty y Azucena por todos esos desvelos, ayunos, regaños, enojos y muchas alegrías que compartimos a lo largo de nueve semestres

A Julio Cesar Cabrera por ser mi apoyo y alentarme en todo este camino y ser mi compañero, mi amigo, mi cómplice y sobre todo mi amor

## DEDICATORIAS

A mis padres Teresa Rojas y José Dominguez por darme la vida, por todo su cariño, por su paciencia, por su confianza, por sus sacrificios y sobre todo por apoyar todas mis decisiones aunque no estuvieran de acuerdo, espero nunca defraudarlos los Amo.

A mis Hermanos Alfredo, Miguel, Cesar y Osvaldo, por todo su apoyo, por sus regaños y por que se que aunque no me lo digan están orgullosos de mi, al igual que yo de cada uno de ellos.

A mis cuñadas Liz, Anel y Elvia por escucharme, apoyarme, defenderme y por todo el cariño que me han brindado en todo este tiempo.

A mis cuatro amores Wendy, Marifer, Lalo y Yael por ser la luz y la alegría en mi vida y porque en momentos difíciles el verlos sonreír me alentó a seguir adelante y para que todo este trabajo les sirva de ejemplo en el futuro de que todo se puede alcanzar

A mi Abuelita Petrita y mi tía Conchita Rojas por ser un gran apoyo en mi familia y sobre todo por su gran cariño

Al hombre que estuvo a mi lado durante toda la carrera, que me apoyo en todo este tiempo, que en los momentos en donde ya no podía estaba ahí para levantarme y darme ánimos, por todos sus desvelos cuidándome cuando me enfermaba, por todos sus consejos, regaños y sobre todo por su inmenso amor que a llenado mi vida de alegrías e ilusiones, Te Amo Julio y espero que este sea el primer paso para que todos nuestros sacrificios valgan la pena y podamos alcanzar nuestros sueños. Mi Gordito te dedico este trabajo, mi esfuerzo y quiero que nunca olvides que tú significas todo para mi Te Amo.

---

---

## ÍNDICE

Índice .....	1
Abreviaturas .....	3
Índice de figuras .....	4
Índice de tablas .....	6
Resumen.....	7
Introducción	
Capítulo 1. La herbolaria	
1.1 Antecedentes históricos de la herbolaria .....	8
1.2 La herbolaria actual .....	11
Capítulo 2. El cuachalalate	
2.1 Taxonomía y descripción de la especie .....	12
2.2 Distribución geográfica de la especie .....	14
2.3 Usos en la medicina tradicional.....	14
2.4 Investigación fitoquímica y de las propiedades medicinales... 16	
Capítulo 3. Los ácidos anacárdicos	
3.1 Los metabolitos primarios y secundarios .....	20
3.2 Los ácidos anacárdicos en la naturaleza.....	27
3.3 Propiedades biológicas de los ácidos anacárdicos.....	29
3.4 Los ácidos anacárdicos del cuachalalate .....	32
Capítulo 4. La técnica de micronúcleos	
4.1 Definición y antecedentes del ensayo de micronúcleos.....	33
4.2 Sistemas de ensayo .....	34
4.3 Ventajas y desventajas del ensayo de micronúcleos .....	37

---

---

Justificación.....	40
Objetivos .....	41
Diagrama de flujo experimental .....	42
Materiales y métodos .....	43
Resultados.....	47
Discusión .....	52
Conclusiones .....	57
Literatura citada.....	58



## ABREVIATURAS

UV	ultravioleta
ADN	ácido desoxirribonucleico
EPC	eritrocito policromático
ENC	eritrocito normocrómico
MN	micronúcleos
EPCMN	eritrocitos policromáticos micronucleados
OMS	Organización Mundial de la Salud
IFF	ifosfamida
FDA	Administración de Drogas y Alimentos (por sus siglas en inglés)
M.O.	médula ósea
S.P.	sangre periférica

---

**ÍNDICE DE FIGURAS**

FIGURA 1. Árbol de cuachalalate.....	13
FIGURA 2. Corteza de cuachalalate .....	13
FIGURA 3. Distribución geográfica del cuachalalate .....	14
FIGURA 4. Estructuras para los compuestos extraídos de <i>Amphipterygium adstringens</i> .....	17
FIGURA 5. Relaciones entre el metabolismo primario y secundario de las plantas.....	20
FIGURA 6. Estructura de la gramina.....	22
FIGURA 7. Estructura del isopreno .....	22
FIGURA 8. Estructura del limoneno.....	23
FIGURA 9. Estructura del ácido abscísico .....	23
FIGURA 10. Estructura del $\beta$ -sitosterol .....	24
FIGURA 11. Estructura del $\alpha$ -caroteno.....	25
FIGURA 12. Estructura del ácido salicílico.....	27

FIGURA 13. Estructuras propuestas para los ácidos anacárdicos del cuachalalate .....	32
FIGURA 14. Representación esquemática del mecanismo de formación de micronúcleos .....	39
FIGURA 15. Frecuencia de EPCMN en 1000 EPC en el estudio del ácido 6-nonadecil salicílico .....	47
FIGURA 16. Frecuencia de la relación de eritrocitos policromáticos y eritrocitos normocrómicos (EPC/ENC) en 1000 eritrocitos en el estudio del ácido 6-nonadecil salicílico .....	48
FIGURA 17. Frecuencia de EPCMN en 1000 EPC en el estudio del ácido 6-metil nonadecil salicílico .....	49
FIGURA 18. Frecuencia de la relación de eritrocitos policromáticos y eritrocitos normocrómicos (EPC/ENC) en 1000 eritrocitos en el estudio del ácido 6-metil nonadecil salicílico .....	50
FIGURA 19. Micronúcleos característicos encontrados en el control positivo .....	51
FIGURA 20. Eritrocitos policromáticos (a) y Eritrocitos normocrómicos (b).....	51

---

**INDICE DE TABLAS**

TABLA 1.	Acumulación de compuestos presentes en el cuachalalate en relación al sexo de la planta .....	16
TABLA 2.	Acumulación de compuestos presentes en el cuachalalate en relación con la temporada .....	18
TABLA 3.	Familias que contienen ácidos anacárdicos .....	28
TABLA 4.	Distribución de los lotes para el ácido 6-nonadecil salicílico .....	43
TABLA 5.	Distribución de los lotes para el ácido 6-metilnonadecil salicílico .....	44
TABLA 6.	Distribución de los lotes para los controles .....	44

## RESUMEN

El cuachalalate se encuentra dentro de las especies más utilizadas en la medicina tradicional mexicana, su corteza se emplea para curar más de 30 enfermedades diferentes.

Los ácidos anacárdicos son los compuestos que más recientemente se aislaron del cuachalalate, por tal razón son pocos los trabajos encontrados acerca de ellos. Los ácidos anacárdicos se han aislado de diferentes plantas y en éstas se han identificado varias actividades entre las que se pueden destacar la antimicrobiana y la anticancerígena.

En este trabajo se realizó un estudio toxicológico para determinar si el ácido 6-nonadecil salicílico y su éster metílico son genotóxicos y citotóxicos. Para esto, se eligió la prueba de micronúcleos en sangre periférica de ratones de la cepa CD1. Se probaron 4 dosis únicas por vía oral por compuesto, estas dosis fueron: 0.75 mg/Kg, 2.5mg/Kg, 5 mg/Kg y 10 mg/Kg. Los controles que se usaron fueron; como control positivo la ifosfamida 60 mg/Kg y como control negativo el vehículo para los compuestos que se utilizó (aceite de maíz). Se tomaron cuatro muestras de sangre periférica de la cola a cada uno de los animales a las 0, 24, 48, 72 horas post-administración, con éstas se realizaron los frotis y el posterior análisis microscópico.

Los resultados obtenidos mostraron que el ácido 6-nonadecil salicílico es un compuesto que no presentó genotoxicidad, pero sí citotoxicidad especialmente a la dosis de 10 mg/kg donde se presentaron diferencias estadísticamente significativas en la relación de EPC/ENC con respecto al control a partir de las 24 horas y con las demás dosis a partir de las 72 horas. En cuanto al ácido 6-metilnonadecil salicílico se encontró que no es genotóxico ni citotóxico ya que no presentó diferencias estadísticamente significativas en la frecuencia de EPCMN y en la relación EPC/ENC con respecto al control.

## INTRODUCCION

### Capítulo 1. La herbolaria

#### 1.1 Antecedentes históricos de la herbolaria

Desde los tiempos más remotos el hombre se ha interesado afanosamente en encontrar el medio de aliviar sus dolencias y curar sus enfermedades, tomando sabiamente la alternativa de recurrir a la naturaleza. (Juscafresa, 1995)

El registro histórico más antiguo le pertenece a los egipcios. Es aquí donde comienza la historia cuando llega a este mundo Imhotep, considerado en vida un sabio de la medicina y dios de la misma después de muerto. Este médico usó la herbolaria de manera sistemática y se le considera el primero porque existe documentación de ello en papiros que describen la curación de cuarenta y ocho casos clínicos con plantas medicinales (Herbolaria en México, 2004).

La historia continúa en la Grecia antigua donde el uso de las plantas fue ampliamente difundido por griegos y romanos entre los cuales Hipócrates y Galeno son los más reconocidos y considerados por la historia como padres de la medicina occidental, estos médicos usaron la herbolaria como medio para reestablecer la salud de los enfermos y sus enseñanzas rigieron el mundo de la medicina hasta la edad media. La herbolaria pasó de los griegos a los romanos y de éstos a los países que surgieron después como España, a este país llega la influencia de Asia menor con la dominación musulmana y con ella los conocimientos más confiables sobre ciencia en el mundo de esa época ya que los musulmanes en ese momento recapitulaban los métodos grecolatinos para acceder al conocimiento de las cosas y entre ellas la herbolaria. La medicina se ve altamente influenciada por dos médicos musulmanes Razis y Avicena, estos médicos retomaron los conocimientos de Hipócrates y Galeno, adhiriendo a ellos los

conocimientos propios del pueblo Árabe y lo difundieron al mundo contemporáneo de su época.

Por su parte en la América precolombina existía una historia herbolaria de por lo menos 3,500 años y que según diferentes autores a la fecha podría tener entre 4,000 y 5,000 años de antigüedad (Herbolaria en México, 2004).

Con la llegada de los españoles a América se produjo un cambio radical entre los habitantes del nuevo continente. La fusión de estas dos culturas terminó con las barreras que habían separado durante siglos no sólo a los pueblos de Europa y América, sino también a otras formas de vida como plantas, animales y microbios, lo que generó daños irreparables a la ecología del Continente Americano. Sin embargo, este encuentro fue benéfico para los europeos, considerando que los habitantes colonizados ya contaban con una antigua y vasta tradición herbolaria basada en el conocimiento empírico de las propiedades y aplicaciones de las plantas medicinales. Los españoles quedaron tan fascinados con esta riqueza botánica que de inmediato llevaron a las cortes europeas noticias sobre la abundancia de las plantas y sus beneficios.

Con estas referencias, Fray Bernardino de Sahagún llegó a México pocos años después, aprendió la lengua mexicana y reunió datos proporcionados por algunos médicos de Tlatelolco para después escribir la *Historia general de las cosas de la Nueva España* (Huerta, 2002).

Por su parte, Martín de la Cruz, primer médico titulado en el Colegio de la Santa Cruz en Santiago Tlatelolco y Juan Badiano un joven alumno, también se interesaron en el tema, en 1552 escribieron un tratado en lengua náhuatl, donde se plasmó el conocimiento sobre plantas curativas y otros medicamentos. Este libro

fue redescubierto hasta el siglo XX y llamado Códice de la Cruz-Badiano (Rosas, 2000; Huerta, 2002).

Conforme se fue formando la cultura mestiza esta área se desarticuló pero jamás desapareció, de esta forma el conocimiento terapéutico de las plantas tomó dos destinos, el primero pasa a formar parte de la teoría de los principios activos que con el tiempo y una compleja historia forma parte de la medicina alópata u ortodoxa y la otra pasó a formar parte de la cultura común y es conocida como herbolaria tradicional.

Una vez que el mestizaje nos dio identidad nacional a todo lo largo y ancho de México, la tradición herbolaria pasó a formar parte del conocimiento popular y éste se albergó en los campesinos e indígenas que conocían las plantas silvestres y sus propiedades terapéuticas, mientras que las mujeres en la casa conocían las propiedades de las plantas que cultivaban en el huerto familiar, generalmente ubicado en la parte posterior de la casa, en el habían vegetales curativos y comestibles.

De este modo, transcurrieron casi trescientos años cultivando una importante cultura herbolaria que se trasmitía de generación en generación de forma verbal hasta que se produjeron importantes y masivas migraciones a las ciudades con lo que las gentes del campo trajeron ese conocimiento a las ciudades (Herbolaria en México, 2004; Martínez, 1967).



## 1.2 La herbolaria actual

Con todo esto, la herbolaria, como se conoce a la práctica terapéutica que utiliza plantas medicinales, continúa vigente y tiene gran arraigo en nuestro país. Las plantas medicinales aún constituyen el recurso más conocido y accesible para grandes núcleos de la población mexicana. La Organización Mundial de la Salud (OMS) reconoce el valor de esta práctica terapéutica y le otorga gran importancia en los esquemas o sistemas públicos para la salud (Maldonado, 1985).

Actualmente se han registrado en México alrededor de 4 000 especies con atributos medicinales (15% de la flora total). Este número coincide con lo informado en varias regiones del mundo por especialistas en la materia, quienes consideran que una de cada siete especies posee alguna propiedad curativa. Sin embargo, se calcula que en México, y en todo el mundo, la validación química-farmacológica y biomédica sólo se ha llevado a cabo en 5% de estas especies.

Según las estimaciones más recientes, alrededor de 15% de la riqueza florística mundial (37 000 especies), posee virtudes curativas, por lo que cabe esperar nuevos y extraordinarios descubrimientos de sustancias que coadyuven a resolver las principales enfermedades que aquejan a la humanidad (Huerta, 2002).

---

## Capítulo 2. El cuachalalate

### 2.1 Taxonomía y descripción de la especie

El cuachalalate es una especie vegetal muy usada en la actualidad en México, las primeras referencias del uso de esta corteza son del siglo XVI y posteriormente en el siglo XX en la obra de Máximo Martínez en 1944. Pero es a partir de hace treinta años que su uso se ha intensificado.

*Amphipterygium adstringens* es conocido comúnmente como cuachalalate, cuachalalá, cuauchalalá, matixerán (Michoacán), volador (Puebla), chalalate, coachalalate, cuachalalatl (Distrito Federal), maceran, pacueco, cuachinalá (Oaxaca). La palabra cuachalalate viene del náhuatl Kojchalalalajtli, koj-kuautli-árbol; chalalajtli-chala-chichalaca-guajolote silvestre (Zamora, 2003).

Anteriormente se consideraba al cuachalalate dentro de la familia *Julianiaceae* (Fernández, 2003), en 2004 se realiza una reclasificación debido a que se encontraron ácidos anacárdicos en la corteza y pasa a formar parte de la familia de las *Anacardiaceae* (Missouri, 2004).

Es un árbol con el tronco bajo, generalmente torcido, muy ramificado, con ramas ascendentes y torcidas, de ramificación simpodial, copa amplia y aplanada, de 8 a 12 m de altura aproximadamente y diámetro máximo de 40 cm. La corteza externa es de aspecto muy áspero y variable, con grandes proyecciones suberificadas que dan la apariencia apostillada en algunas áreas y lisas en otras, de color moreno grisáceo o gris plomizo. La corteza interna es de color café rojizo claro y de textura fibrosa; la corteza es muy compacta y dura, con 5 mm de grosor total en las áreas lisas. El árbol tiene hojas dispuestas en espiral, tienen flores masculinas en panículas aglomeradas y flores femeninas solitarias en las axilas. El cuachalalate florece de marzo a junio y empieza a fructificar en mayo y junio. El fruto madura del mes de noviembre a enero (Zamora, 2003)



Figura 1. Árbol del cuachalalate.

Época de lluvias (Ortiz, 2004). Época de secas (Foto cortesía de Rosas)



Figura 2. Corteza del cuachalalate.

In situ (Foto cortesía de Rosas). Para su venta

## 2.2 Distribución geográfica de la especie

Se encuentra distribuido en varios estados de la República Mexicana, entre los que se encuentran Jalisco, Morelos, Puebla, Michoacán, Guerrero y Oaxaca. Habita en climas cálidos, semicálidos y templados. Se desarrolla en bosque tropical subcaducifolio y caducifolio, matorral xerófilo, bosque espinoso, mesófilo de montaña y pino-encino (Solares y Gálvez, 2002; Fernández 2003).



Figura 3. Distribución geográfica del cuachalalate (Missouri, 2004).

## 2.3 Usos en la medicina tradicional

El cuachalalate es usado comúnmente en la República Mexicana; su corteza se expende en la mayoría de los mercados entre los que destaca el mercado de Sonora en el Distrito Federal, debido a que se le atribuyen diversas propiedades curativas. Utilizado principalmente como cocimiento, para tratar úlceras, cáncer de estómago, gastritis y ciertas lesiones cutáneas. Otra forma de preparación para el tratamiento de úlceras consiste en remojar la corteza hasta que el agua tome color para administrarla como agua de uso. Para las heridas se bebe su cocimiento o se aplica en polvo sobre ellas o se macera en agua y con esta se lava la lesión. Los granos se curan mediante la aplicación de la goma blanca o resina de la corteza; las rozaduras de los bebés se lavan una vez diariamente por cinco días. Se utiliza

también en infecciones vaginales, fiebre puerperal, flujo de mujeres, frío, inflamación, caída de la matriz y ovarios. Se usa también en malestares digestivos, dolor de estómago, infección o inflamación intestinal, para limpiar el estómago, para el hígado, para la vesícula, contra tifoidea y en problemas bucales como dolor de muelas, para endurecer las encías, estomatitis y casos de fuegos en la boca (Martínez, 1967; Hoffmann, 1992; Juscafresca, 1995)

Se emplea en afecciones respiratorias como tos, amigdalitis, resfriados, tuberculosis y otras enfermedades pulmonares. Se utiliza también para inflamación del riñón, para la circulación sanguínea, para várices y úlceras varicosas, tiene efecto analgésico para dolor de cintura, cabeza, espalda, pulmones, hernia, reuma o punzadas. Otras aplicaciones medicinales son: fiebres intermitentes, paludismo, manchas en piel, gangrena y como antidiabético (Navarrete, 1982; Mata et al., 1991; Rosas, 2000; Fernández, 2003; Martínez y Flores 2003).

Dentro de las publicaciones importantes acerca de los usos del cuachalalate, cabe mencionar que existen algunas patentes registradas en Japón, en las cuales se reporta la realización de productos preparados con esta planta. Una de estas patentes se refiere a un tónico para el cabello, cuyo efecto principal es detener y evitar la caída del cabello con número de patente JP 11349452 . En otra patente del cuachalalate se reporta la preparación de una composición herbal, en la que se emplea el cuachalalate en combinación con otra planta del género *Equisetum*, preparados en bolsas para té, útil para el tratamiento de las hemorroides. También se reportan otras patentes de lociones y cremas en las que se hace uso del cuachalalate (número de patente JP 2000169497), pero, ninguna de éstas se han registrado en México (Fernández, 2003)

## 2.4 Investigación fitoquímica y de las propiedades medicinales

Las investigaciones del cuachalalate en el ámbito fitoquímico se han realizado principalmente en la corteza del árbol, ya que es la parte de la planta que se emplea para ejercer su efecto terapéutico (Olivera et al., 1999).

De dicha corteza, se han identificado a la sarsapogenina (González y Delgado, 1962) y se han aislado e identificado varios ácidos triterpénicos como el ácido masticadienónico; el ácido instipolinácico (Domínguez et al., 1983); el ácido cuachalálico (Watson, 1987); el ácido 3- $\alpha$ -hidroximasticadienónico (Navarrete, 1982); el ácido *epi*-oleanólico, el ácido 3-*epi*-hidroximasticadienónico, el ácido isomasticadienónico,  $\beta$ -sitosterol, el triterpeno 27-acetoxi-3 $\alpha$ , 15 $\alpha$ -dihydroxidammara-12, 24-dieno; ácidos alquilfenólicos y aldehídos alquilfenólicos (Navarrete et al., 1989; Mata et al., 1991); el ácido 6-pentadecil salicílico, ácido 6-heptadecil salicílico y el ácido 6-nonadecil salicílico (Navarrete et al., 1989) (Figura 4).

Olivera y colaboradores (1991) encontraron que de acuerdo al sexo y la temporada se encuentran distintas composiciones de triterpenos en la corteza de Cuachalalate (Tabla 1 y 2).

Tabla 1. Acumulación de compuestos presentes en el cuachalalate en relación al sexo de la planta (% en peso seco).

Sexo	Compuesto 1	Compuesto 2	Compuesto 3	Compuesto 4
Femenino	1.717	0.780	0.172	0.251
Masculino	2.329	0.912	0.368	0.056

Compuesto 1: ácido masticadienónico; compuesto 2: ácido 3- $\alpha$ -hidroximasticadienónico; compuesto 3: mezcla de ácido masticadienónico/ isomasticadienónico; compuesto 4: ácido 3- $\alpha$ -hidroximasticadienónico / una mezcla de compuestos desconocidos.

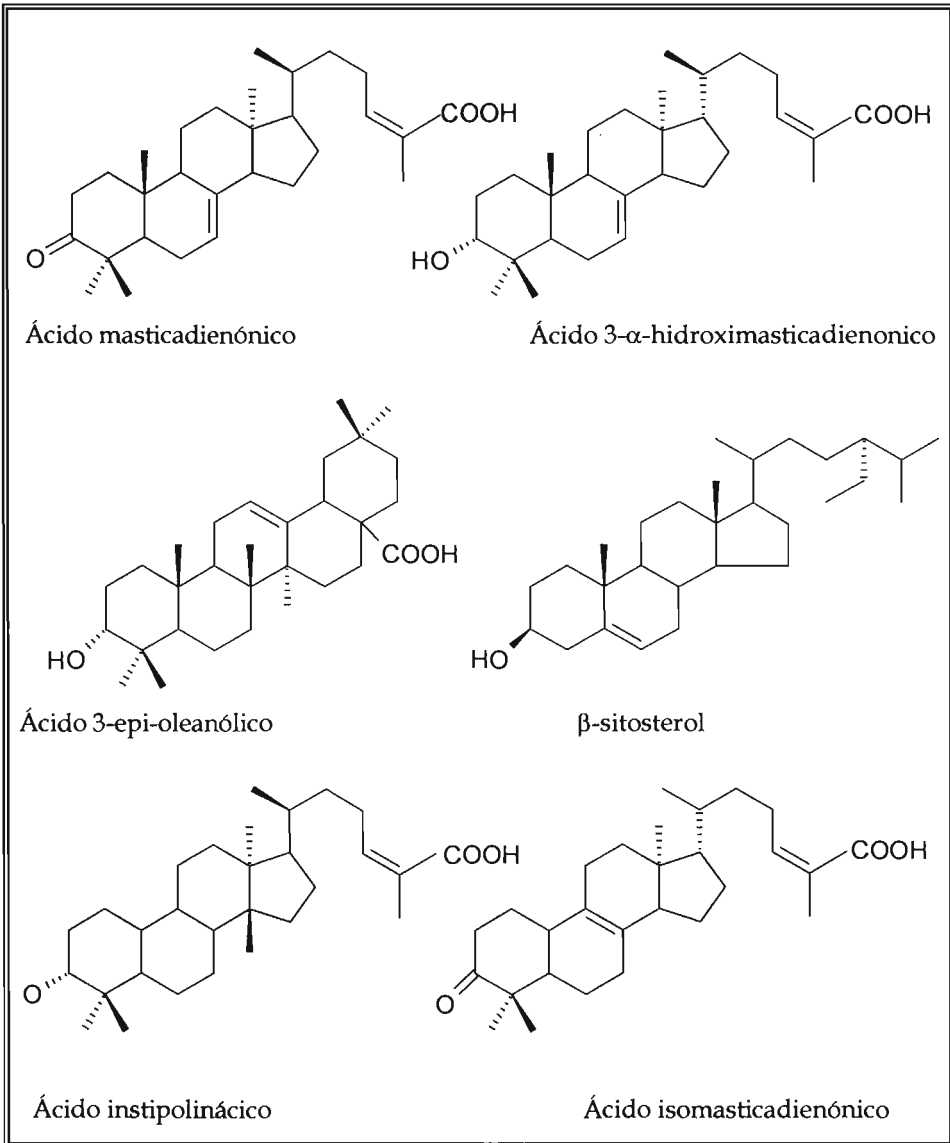


Fig. 4 Estructuras para los compuestos extraídos de *Amphipterygium adstringens* (Rosas, 2000).

Tabla 2. Acumulación de compuestos presentes en el cuachalalate en relación con la temporada (% en peso seco)

Mes	Compuesto 1	Compuesto 2	Compuesto 3	Compuesto 4
Noviembre	1.311	0.891	0.358	0.00
Febrero	1.883	0.183	0.172	0.243
Mayo	0.852	0.617	0.009	0.064

Compuesto 1: ácido masticadienónico; compuesto 2: ácido 3- $\alpha$ -hidroximasticadienónico; compuesto 3: mezcla de ácido masticadienónico/ isomasticadienónico; compuesto 4: ácido 3- $\alpha$ -hidroximasticadienónico / una mezcla de compuestos desconocidos.

De los compuestos aislados de la corteza del cuachalalate se ha demostrado que los compuestos triterpénicos como el ácido 3- $\alpha$ -hidroximasticadienónico, el ácido masticadienónico,  $\beta$ -sitosterol y el ácido 3- *epi*-oleanólico; poseen el efecto gastroprotector. El compuesto con mayor actividad fue el ácido 3- *epi*-oleanólico, seguido por el ácido 3- $\alpha$ -hidroximasticadienónico,  $\beta$ -sitosterol y ácido masticadienónico (Benítez, 1998; Navarrete et al., 1998).

Los ácidos 3- $\alpha$ -hidroximasticadienónico y masticadienónico ejercieron un efecto hipocolesterolémico en una dosis de 17 mg/kg. El colesterol sanguíneo se midió 24 horas después de la inyección y se obtuvo un decremento promedio de 34 mg/100 mL y 19 mg/100 mL, 45 y 27 por ciento respectivamente (Navarrete, 1982).

En otro estudio se demostró la actividad antitumoral de los extractos metanólicos de la corteza en ensayo *in vivo* en ratones con adenocarcinoma mamario produciendo un 54 por ciento de disminución del tumor comparado contra el control (González et al., 1962).



Mediante estudios experimentales, se ha comprobado la actividad antiulcerosa de los extractos acuosos de la corteza, la cual no se relaciona con el efecto antagonista de los receptores H<sub>2</sub> de la histamina (Fernández, 2003).

El cocimiento de la corteza y de extracto de acetato de etilo administrados en ratas por vía oral e intraperitoneal ejercieron un efecto antiulcerogástrico inhibiendo la secreción de jugo gástrico estomacal y contribuyendo a la más rápida cicatrización del epitelio y de la mucosa gástrica (Rosas, 2000).

Además se ha estudiado sus propiedades para actuar como filtro solar. El extracto se comporta como un filtro solar de mínima protección, teniendo su rango de absorción de 255 a 320 nm. Cumple así mismo, con varias propiedades deseables en los filtros solares, como son: absorber la radiación UV en la zona deseada, estabilidad química, características fisicoquímicas apropiadas para su procesamiento tecnológico, es insípido y en solución hidroalcohólica tiene un olor agradable (Arroyo, 1996).

En un estudio reciente se probó la actividad antiinflamatoria de la corteza del cuachalalate en donde se utilizaron dos extractos uno acuoso y el otro hexánico, esto se realizó en dos modelos agudos inflamatorios observándose que en el modelo en donde se induce un edema en la pata de ratón el extracto acuoso presenta un inhibición de un 73.5% y en el extracto hexánico de 14.4%. En el segundo modelo donde se induce un edema en la oreja de ratón, se observa que el extracto hexánico posee un actividad dosis dependiente mientras que el extracto acuoso no presenta tal efecto (Oviedo et al., 2004).

### Capítulo 3. Los ácidos anacárdicos

#### 3.1 Los metabolitos primarios y secundarios

Todas la células vegetales realizan procesos metabólicos comunes que conducen a la formación de compuestos como los azúcares simples, aminoácidos, nucleótidos, ácidos grasos y polímeros derivados de ellos, esenciales para la vida celular y, en general de la planta. Estos procesos constituyen, en su conjunto, el metabolismo primario, y los compuestos indicados se denominan metabolitos primarios. Además de estos procesos metabólicos primarios, en las plantas se pueden desarrollar otras rutas que conducen a la formación de compuestos usualmente peculiares de ciertos grupos taxonómicos. Estas rutas constituyen el metabolismo secundario (Fig. 5) y sus productos se denominan metabolitos secundarios (Azcón y Talón, 2000).

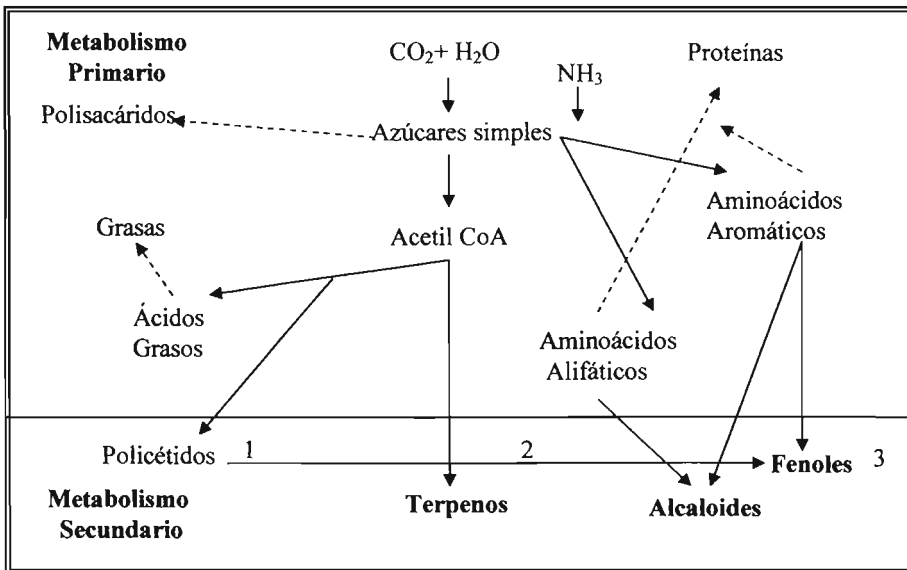


Figura 5. Relaciones entre el metabolismo primario y secundario de las plantas. 1: ruta del acetato - malonato, 2: ruta del acetato - mevalonato, 3: ruta del ácido siquímico (Azcón y Talón, 2000).

Los metabolitos secundarios de las plantas se habían considerado sustancias de desecho para el vegetal, carentes de una función fisiológica definida. En la actualidad, se conoce que, si bien los denominados compuestos secundarios no tienen como los metabolitos primarios una importancia directa para la célula productora, sí pueden tener una significancia para el organismo productor como un todo. Muchos metabolitos secundarios están implicados en relaciones ecológicas, es decir, de la planta productora con los otros organismos de su medio natural. Ejemplos de ello son los pigmentos de las flores que atraen a los insectos polinizadores y los compuestos que inhiben el crecimiento de otros organismos que protegen a la planta productora de infecciones o de los depredadores. Otros compuestos formados en las rutas del metabolismo secundario tienen importancia fisiológica ya que sirven como señales que integran la diferenciación celular y el metabolismo en diferentes partes del organismo vegetal multicelular (Azcón y Talón, 2000).

Los tres principales grupos de metabolitos secundarios vegetales son: los terpenos, los fenoles y los alcaloides.

### **ALCALOIDES**

Entre las sustancias químicas producidas por las plantas se encuentra un extenso grupo de compuestos muy diversos a los que se les ha llamado, en forma genérica, alcaloides, debido a que la gran mayoría de ellos son de naturaleza básica. Dicho nombre se deriva del término álcalis-vegetal, primera denominación que se le dió a este tipo de compuestos hace dos siglos. No es fácil hacer una definición de los alcaloides, debido a la gran heterogeneidad que existe entre ellos y de hecho, las únicas características comunes que poseen todos ellos son las siguientes: contienen nitrógeno en su estructura, son de naturaleza básica en su gran mayoría y poseen una marcada actividad fisiológica (Maldonado, 1985).

Existe una relación directa entre la complejidad de estructura química del alcaloide y su distribución en el reino vegetal; así la gramina, un alcaloide de estructura simple, está mucho más ampliamente distribuido que la estricnina, un alcaloide muy complejo que solo se encuentra en algunas especies de *Strychnos* (Valencia, 1995; Azcón y Talón, 2000).

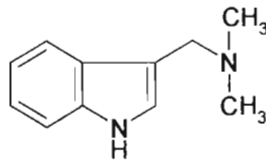


Figura 6. Estructura de la gramina

## TERPENOS

En el reino de las plantas, especialmente en aquellas que contienen clorofila, se encuentra un grupo de compuestos de diversas estructuras llamados terpenos; todos tienen un origen biosintético común formados por la unión de dos o más unidades de isopreno, o bien, existen como una variación de esta misma unidad (Valencia, 1995).

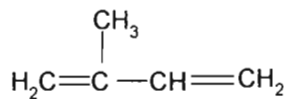


Figura 7. Estructura del isopreno

Los isoprenoides se clasifican, según el número de unidades de isopreno de que se componen en:

- ❖ Los monoterpenos (2 unidades de isopreno) presentan funciones oxigenadas, como aldehídos o alcoholes. Como ejemplos se pueden destacar: limoneno, mentol, timol y alcanfor. Todos ellos con acción antiséptica y expectorante.

Muchos compuestos se acumulan en estructuras vegetales específicas y constituyen las esencias naturales que se utilizan en cosmética y perfumería.

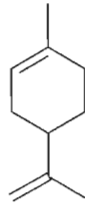


Figura 8. Estructura del limoneno

- ❖ Los sesquiterpenos (3 unidades de isopreno), además de componentes de esencias como el farnesol, se encuentran entre otros compuestos, la fitohormona ácido abscísico y feromonas.

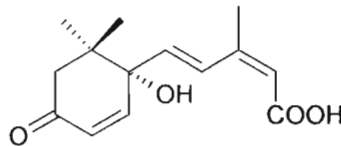


Figura 9. Estructura del ácido abscísico

- ❖ Los diterpenos (4 unidades de isopreno) de relevancia fisiológica son los ácidos resínicos abiótico constituyentes de las resinas localizadas en depósitos o canales de las gimnospermas. Un ejemplo típico es el caso del taxol, compuesto obtenido a partir de las cortezas de tejo americano (*Taxus brevifolia*) que ha mostrado una elevada eficacia en el tratamiento de algunos tipos de cánceres (Kuclinsk, 2000).
- ❖ Los triterpenos (6 unidades de isopreno) en general son compuestos policíclicos y están ampliamente distribuidos en el reino vegetal. Triterpenos y esteroides desempeñan importantes funciones fisiológicas en las plantas y algunos tienen un gran interés farmacológico.

Entre las saponinas triterpénicas destacan los ginsenósidos aislados de *Panax ginseng*, utilizados ampliamente en medicina por su acción estimulante y antiasténica.

Los esteroides vegetales más universales son campesterol, estigmasterol y sitosterol. Respecto a la función que tienen estos compuestos en la planta, es similar a la de los esteroides de los animales: son constituyentes de membranas biológicas y presentan acción hormonal. Además de los esteroides indicados, de distribución general en los vegetales, las plantas presentan otro grupo de esteroides de distribución más restringida y característica de determinadas familias y géneros. Dentro de este grupo de esteroides figuran las saponinas esteroideas y los glucósidos cardiotónicos de gran interés en la industria farmacéutica (Salisbury, 1994).

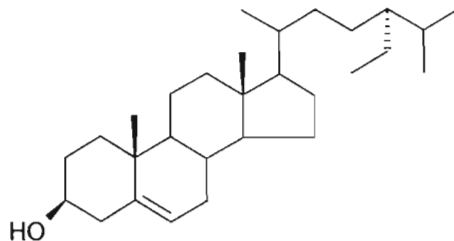


Figura 10. Estructura del  $\beta$ -sitosterol

La saponina esteroídica más utilizada con este fin es la diosgenina, aislada de varias especies del género *dioscorea*. También estas saponinas son ampliamente utilizadas como expectorantes, antiinflamatorios, antifúngicos y antibacterianos.

Los glucósidos cardiotónicos más importantes para la industria son la digoxina y la digitoxina, aisladas de especies del género *Digitalis*. En medicina estos compuestos se utilizan principalmente como cardiotónicos, fármacos irremplazables en el

tratamiento de la insuficiencia cardiaca y algunas arritmias. La digoxina es uno de los 10 productos naturales más prescritos actualmente (Azcón y Talón, 2000).

Los triterpenos del cuachalalate son triterpenoides tetracíclicos, que forman un numeroso grupo de productos naturales, los cuales se dividen en varios subgrupos de acuerdo con algunas variaciones del esqueleto. Los principales son los siguientes: escualeno, fusidano - lanostano, damarano - eufano, en el cual se encuentran los ácidos masticadienónicos e iso - masticadienónico del cuachalalate (Rosas, 2000).

\* Los tetraterpenos (7 unidades de isopreno) sin funciones oxigenadas forman el grupo de los carotenos, mientras que los que poseen oxígeno en su molécula constituyen el grupo de las xantofilas; ambos grupos de compuestos constituyen los carotenoides. Carotenos y xantofilas se presentan en las hojas de todas las plantas y también en flores y frutos, localizados en los plastos. Se han descubierto más de 400 carotenoides diferentes en la naturaleza, sí bien sólo unos pocos se encuentran en una especie dada.

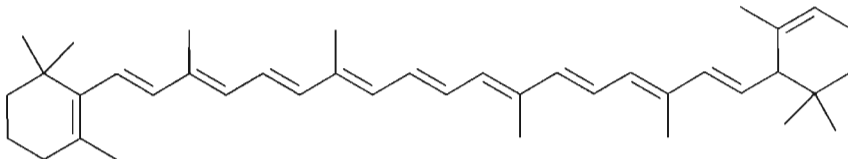


Figura 11. Estructura del  $\alpha$ -caroteno

\* Los politerpenos (más de 8 unidades de isopreno) pueden llegar a presentar un grado de polimerización muy elevado, como es el del caucho de 3000 - 6000 restos de isopreno. La mayor parte del caucho comercial se obtiene del látex de la planta tropical *Hevea brasiliensis*, miembro de la familia Euphorbiaceae (Salisbury, 1994).

## FENOLES

Los fenoles son compuestos de estructura aromática con uno o varios grupos hidroxilo. El compuesto básico es el fenol, pero la mayoría de estos compuestos son polifenoles. Entre los polifenoles vegetales, de los que actualmente se conocen más de 8000, figuran las quinonas fenólicas, las cumarinas, los lignanos y los flavonoides. Estos últimos compuestos forman el grupo más numeroso, un flavonoide típico es la quercetina. Además de las estructuras monoméricas y diméricas existen importantes grupos polímeros fenólicos, como los taninos (Azcón y Talón, 2000).

La actividad fisiológica de los compuestos fenólicos de las plantas es muy diversa. Algunos de ellos pueden actuar en la fisiología interna de las plantas que los contienen, otros pueden tener importancia en la ecología, algunos intervienen en el transporte electrónico fotosintético y en la regulación de algunas enzimas. Hay compuestos fenólicos inhibidores de la germinación de semillas, del proceso de transporte de las membranas y de algunos tipos de hormonas de crecimiento. Los fenoles que absorben la luz ultravioleta pueden desempeñar algún tipo de función, al guiar a los insectos que realizan la polinización a las flores que los contienen. Hay constituyentes fenólicos que son repelentes o tóxicos a los herbívoros, mientras que otros afectan la reproducción de los roedores; la fuerte acción irritante de la hiedra venenosa y de otros miembros de las *Anacardiáceas* se debe a la presencia de orto-difenoles con largas cadenas insaturadas. Irritantes similares pero menos poderoso se encuentran en los frutos de *Ginkgo biloba* y en la raíz de ginger (Valencia, 1995).

Existen fenoles simples como el fenol, el catecol y el floroglucinol. Existen también derivados con cadenas laterales de uno, dos o tres carbonos, representados entre otros compuestos, por el ácido salicílico, el ácido p-hidroxifenilacético y el ácido caféico, un ácido hidroxicinámico ubicuo en las células de las plantas superiores.



El ácido salicílico es un efectivo agente alelopático, por ejemplo en *Quercus falcata*. Un derivado de este compuesto, el ácido acetilsalicílico, es ampliamente utilizado en medicina como analgésico (Azcon y Talón, 2000).

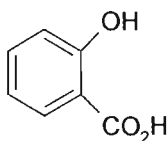


Figura 12. Estructura del ácido salicílico

Otro grupo que se encuentra dentro de los fenoles son los lípidos fenólicos estos se dividen en dos grupos los de cadena larga, en la cual la cadena es un isoprenoide y que derivan biogenéticamente del mevalonato y los no isoprenoides o de origen policétido con cadenas no ramificadas como los ácidos anacárdicos.

### 3.2 Los ácidos anacárdicos en la naturaleza

La biosíntesis de los ácidos anacárdicos no ha sido descrita en su totalidad, inicialmente se proponía que se obtenían a partir de una condensación de Claisen y que el precursor era un policétido, pero en la actualidad se sabe que los ácidos anacárdicos derivan de los ácidos grasos.

Principalmente los ácidos anacárdicos se han aislado de especies de la familia Anacardiaceae. Una de las especies más estudiada es *Anacardium occidentale*. Sin embargo, también se encuentran en otras especies como se muestra en la siguiente tabla (Tyman, 1979).

Tabla 3. Familias que contienen ácidos anacárdicos (Tyman, 1979).

Familia	Origen Botánico	Componentes Mayoritarios	Fórmula
Anacardiaceae	<i>Anacardium occidentale</i>	Ácidos anacárdicos (C <sub>15</sub> )	*Ácido 6-pentadecilsalicílico *Ácido 6-[8'(Z)-pentadecil]-salicílico *Ácido 6-[8'(Z),11'(Z)-pentadecadienil]-salicílico *Ácido 6-[8'(Z),11'(Z),14'-pentadecatrienil]-salicílico
	<i>Anacardium giganteum</i> Hancock	Ácido anagigántico	*Ácido 6-undecilsalicílico
	<i>Pentaspadon motleyi</i> Hook	Ácido pelandjauico	*Ácido 6-[8'(Z)-heptadecenil] salicílico *Ácido 6-[8'(Z),11'(Z)-heptadecadienil] salicílico
	<i>Pentaspadon officinalis</i> Holmes	Ácido pelandjauico	
Gymnospermae	<i>Ginkgo biloba</i>	Ácido ginkgólico Ácido ginkgolínico	Ácido 6-tetradecil salicílico
Compositae	<i>Chrysanthemum frutescens</i>	Frutescina y dimetil frutescina	* 6- metil hexa-2,4- dinil Salicilato * 6- metil penta-2,4- dinil Salicilato
Lichens	<i>Sphaerophorin cetraria</i>	Ácido microfilínico	

### 3.3 Propiedades biológicas de los ácidos anacárdicos

Como grupo químico los ácidos anacárdicos se han detectado en muchas especies vegetales pero las propiedades biológicas han sido poco estudiadas, estos ácidos han sido utilizados en la industria automotriz y de pinturas. Sin embargo actualmente se han venido descubriendo diversas propiedades biológicas, que recientemente se están explotando en el área clínica.

Kubo y colaboradores (1993-a) detectaron una potente actividad antibacteriana en una selección de 12 microorganismos sobre todo contra las bacterias Gram positivas como *Streptococcus mutans*, *Brevibacterium ammoniagenes*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* y *Propionibacterium acnes*, los ácidos anacárdicos usados fueron aislados de *Anacardium occidentale*, además de que se usaron derivados de éstos y se encontró que al disminuir el número de dobles enlaces en la cadena, también decrece la actividad antibacterial contra las bacterias Gram-positiva a excepción de *Propionibacterium acnes*.

Muroi y colaboradores (2004) señalaron un efecto sinérgico entre ácidos anacárdicos y metilicina para el *Staphylococcus aureus* resistente a metilicina. El efecto sinérgico decrece cuando se incrementa el número de dobles enlaces en la cadena alquílica.

Por otro lado, también se ha reportado la inhibición de la síntesis de ADN por parte del ácido anacárdico al inhibir a la ADN  $\beta$  polimerasa, también aumenta la potencia de agentes anticancerígenos como la bleomicina y el cis-platino (Chen et al., 1998).

Una de las propiedades biológicas de los ácidos anacárdicos es la inhibición de la síntesis de prostaglandinas, tirosina, y lipooxigenasa (Paramashivappa et al., 2001).

Toyomizu y colaboradores (2000) comprueban el efecto como desacopladores de electrones de cuatro ácidos anacárdicos: ácido 6-pentadecilsalicílico, ácido 6-[8'(z)-pentadecil]-salicílico, ácido 6-[8'(z),11'(z)-pentadecadienil]-salicílico y ácido 6-[8'(z),11'(z),14'-pentadecatrienil]-salicílico en la fosforilación oxidativa en la mitocondria del hígado de rata.

Masuoka y Kubo (2003) hacen una investigación sobre la enzima xantina oxidasa. Ellos observan que el ácido 6-[8'(Z),11'(Z),14'-pentadecatrienil]-salicílico se une al sitio alostérico cercano a la unión con la xantina siendo una inhibición reversible y no competitiva.

Entre las propiedades biológicas que se les ha encontrado a los ácidos anacárdicos son las citotóxicas que diversos autores han aprovechado para el combate a las células cancerosas.

Kubo y colaboradores (1993-b) aíslan del jugo de la manzana de *Anacardium occidentale* tres ácidos anacárdicos: Ácido 6-[8'(Z)-pentadecil]-salicílico, Ácido 6-[8'(Z),11'(Z)-pentadecadienil]-salicílico y Ácido 6-[8'(Z),11'(Z),14'-pentadecatrienil]-salicílico con acción citotóxica contra células de carcinoma mamario BT-20 y una moderada actividad citotóxica en células de carcinoma del epitelio de la cérvix.

Itokawa y colaboradores (1987) aísla siete fenoles de cadenas largas de *Ginkgo biloba* L. Tres de ellos presentan una actividad antitumoral contra sarcoma 180 en ratones en una dosis de 40 mg/kg, estos compuestos son un ácido anacárdico (ácido 6-pentadecil salicílico), bilobol y cardanol. El efecto antitumoral es reportado para el ácido anacárdico (+ +), el bilobol (+ + +) y cardol (+ + +).

Dos años después Itokawa y colaboradores (1989) encuentran una actividad antitumoral contra el sarcoma 180 y leucemia linfocítica P-388 en fenoles de cadena larga de *Ginkgo biloba* L. Ellos utilizan nuevamente el ácido 6-pentadecil salicílico y señalan que éste no presenta actividad en leucemia linfocítica P-388 a una dosis de 100 mg/ kg.

Rea y colaboradores (2003) aíslan de una planta medicinal llamada *Ozoroa insignis* los ácidos anacárdicos: ácido 6-pentadecilsalicílico y ácido 6-(8-Z-pentadecenil) salicílico siendo los responsables de la actividad citotóxica de esta planta. Este efecto probó en un estudio de la actividad citotóxica en carcinona hepatocelular Hep G2, adenocarcinoma mamario MDA-MB-231, adenocarcinoma mamario MCF7, melanoma humano SK-MEL-28, Hs 578T carcinoma mamario ductal y carcinoma primario de vejiga 5637.

### 3.4 Los ácidos anacárdicos del cuachalalate

Para el Cuachalalate Navarrete y colaboradores (1989) aíslan tres ácidos anacárdicos, estos son: el ácido 6-pentadecil salicílico, el ácido 6-heptadecil salicílico y el ácido 6-nonadecil salicílico (Fig 13). Estos ácidos se separaron como ésteres metílicos y se encontró que la mezcla de éstos no es tóxica para *Artemia salina* ( $LC_{50} > 1000 \text{ ppm}$ )

En un estudio reciente se descubrió que los ácidos anacárdicos extraídos del cuachalalate poseen una actividad citotóxica importante sobre varias líneas celulares de cáncer humano (Rosas et al, 2004).

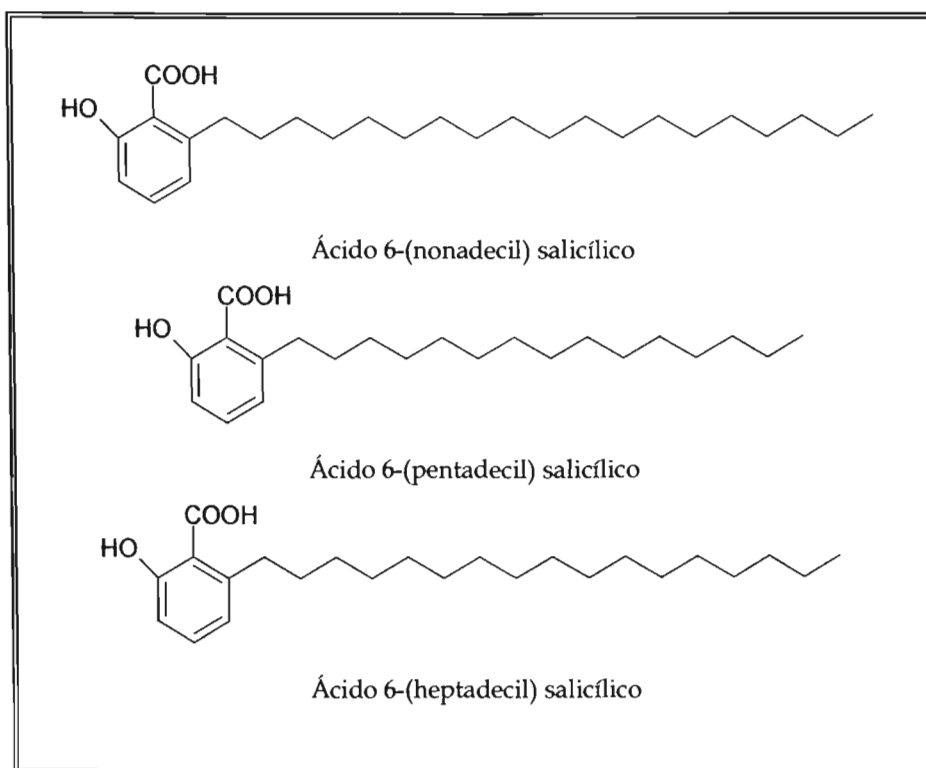


Figura 13 Estructuras propuestas para los ácidos anacárdicos del cuachalalate

## **Capítulo 4. Los Micronúcleos**

### **4.1 Definición y antecedente del ensayo de micronúcleos**

Los micronúcleos son fragmentos intracitoplasmáticos de cromatina que se encuentran separados del núcleo principal y que se forman a partir de la ruptura de fragmentos cromosómicos acéntricos o bien por aquellos cromosomas que sufren un rezago anafásico, lo cual se traduce en la aparición de un pequeño núcleo en células anucleadas como los eritrocitos o bien en el citoplasma de nucleadas como linfocitos o espermatogonias (Hernández, 1996; Speit y Henderson 2004).

La existencia de micronúcleos ya ha sido reconocida durante muchos años, su asociación con daño cromosómico fue estudiada en trabajos del campo de la radiación en donde se menciona su frecuencia. El primer intento serio del uso de la frecuencia de micronúcleos como monitor de daño citogenético aparece reportado por Evans en 1959. El utilizó la frecuencia de micronúcleos como una medida de daño citogenético inducido en la punta de la raíz de las habas por neutrones rápidos y rayos gamma en presencia y ausencia de oxígeno, encontrando que las cromátides, cromosomas e isocromátides rotas, dan origen a la aparición de fragmentos acéntricos en la mitosis y estos fragmentos son excluidos del núcleo principal apareciendo en la siguiente interfase como micronúcleos.

En un estudio *in vitro*, se informa que los aspectos de correlación de las células micronucleadas correspondían con los esperados del análisis de metafases para aberraciones en linfocitos humanos cultivados e irradiados con rayos X (Fenech, 2000; Miranda et al., 2004).

Fue en los años de 1966 y 1970 cuando Schroeder recomendó el uso de frotis de médula ósea para detectar daño in vivo de mutágenos químicos, demostrando la presencia de micronúcleos en las células de dicha médula en relación con daño citogenético.

Aproximadamente a principios de 1970, Schmid y Heddle iniciaron estudios para determinar que parámetros podían servir como los más útiles indicadores de daño citogenético en médula ósea in vivo. Este trabajo condujo a la conclusión de que la incidencia de EPC micronucleados era particularmente un índice útil de daño citogenético de médula ósea *in vivo* (Schmid, 1975).

En el año de 1980 MacGregor y colaboradores, realizaron experimentos para observar la frecuencia de micronúcleos en sangre periférica y probar que ésta podría ser utilizada como un indicador de daño citogenético en eritroblastos (Calderón y Ramírez, 1992)

#### **4.2 Sistemas de ensayo**

El ensayo in vivo de micronúcleos en mamíferos está especialmente indicado para evaluar el riesgo mutagénico, ya que permite tomar en consideración factores del metabolismo in vivo, de la farmacocinética y de los procesos de reparación del ADN, si bien dichos factores pueden variar según la especie, el tejido y el aspecto genético considerado. Los ensayos in vivo también resultan útiles para profundizar en el estudio de los efectos mutagénicos detectados en ensayos in vitro (FDA, 2003).

Esta prueba se puede realizar en una gran variedad de células tanto in vivo (en médula ósea, sangre periférica y células fetales de hígado) como in vitro utilizando células tanto de animales como humanas por ejemplo, se ha reportado esta prueba en hepatocitos de rata en células de hámster chino V79 e incluso linfocitos humanos y queratinocitos (Hernández, 1996).



El ensayo puede realizarse de dos maneras:

- a) Se administra la sustancia de prueba a los animales en una sola ocasión. Se extraen muestras de la médula ósea o de sangre periférica al menos dos veces.
- b) Si se efectúan dos o más administraciones a intervalos de 24 horas, ha de tomarse una muestra transcurridas de 18 a 24 horas desde la última administración si se trata de médula ósea y de 36 a 48 horas desde la última administración en el caso de la sangre periférica (FDA, 2003).

En el estudio agudo se monitorea la presencia de micronúcleos en eritrocitos policromáticos, esto se debe a que éstas son células jóvenes (reticulocitos) recientemente liberadas a la circulación que presentan una coloración mezclada de basofilia y eosinofilia por lo que presentan un tinte azulado violáceo, son generalmente un poco mayores que los eritrocitos normocrómicos y proceden de normoblastos que pierden su núcleo antes de que la hemoglobinización del protoplasma sea completa; generalmente un aumento en su número con respecto a los valores normales indica una eritropoyesis aumentada. La coloración azulada que presentan los EPC es por la presencia de ácido ribonucleico en el momento de su diapedesis hacia la circulación y por la falta de aproximadamente 20% del contenido final de hemoglobina, por lo que aún conservan parte del aparato ribosómico para terminar la síntesis y constituir de esta manera una célula madura. Debido a que son células producidas y liberadas durante el tiempo de estudio constituyen la manera más eficaz de evaluar en ellas la afección de la actividad medular así como la capacidad clastógena de los compuestos en corto tiempo (Hernández, 1996; Kirsch-Volders et al., 1997).

De acuerdo con Mac Gregor el tiempo de vida de un eritrocito en ratón es de 30 días y considera que el ciclo celular es de 10 a 20 horas. El lapso que transcurre de la división a la enucleación es de 6 horas y el tiempo de los EPC en médula ósea es de 24 horas (Hernández, 1996).

Si se emplea médula ósea, se recomienda el uso de ratones o ratas, pero también pueden utilizarse otras especies de mamíferos adecuadas. Si se emplea sangre periférica, se recomienda el uso de ratones. Deben usarse animales jóvenes y sanos de cepas utilizadas habitualmente en laboratorio. La variación del peso de los animales al empezar el estudio debe ser mínima y no exceder de  $\pm 20\%$  del peso medio de cada sexo ( Hayashi et al., 2000).

Las células de médula ósea suelen tomarse del fémur o la tibia, de los animales recién sacrificados, se preparan y se tiñen según métodos establecidos. La sangre periférica se extrae de la vena caudal o de otro vaso sanguíneo adecuado. Las células hemáticas se someten inmediatamente a una tinción supravital o se extienden en frotis y luego se tiñen. Si se emplea un colorante específico del ADN (por ejemplo, naranja de acridina o Hoechst 33258 más pironina-Y) pueden evitarse algunos de los artefactos que aparecen cuando se utiliza un colorante que no es específico del ADN, pero no por ello han de descartarse los colorantes convencionales (coloración de Giemsa, etc.). También pueden utilizarse otros sistemas (por ejemplo, columnas de celulosa para eliminar las células nucleadas), siempre que se tenga constancia de que resultan adecuados para la preparación de micronúcleos en laboratorio (Salamone et al., 1980).

Para cada animal, se determina la relación entre los eritrocitos inmaduros y el total de eritrocitos (inmaduros + maduros) en un recuento de al menos 200 eritrocitos si se trata de médula ósea y de 1000 si se trata de sangre periférica. Antes de analizarlos al microscopio, se codifican independientemente todos los portaobjetos,

incluidos los controles positivos y negativos. Se determinará la cantidad de eritrocitos inmaduros micronucleados en un mínimo de 2000 eritrocitos inmaduros por animal. Puede obtenerse más información contando los eritrocitos maduros con micronúcleos. En el análisis de los portaobjetos la proporción de eritrocitos inmaduros respecto al total de eritrocitos no debe ser inferior al 20 % del valor del control. Si los animales han sido tratados de forma continua durante cuatro semanas o más, también puede determinarse la cantidad de micronúcleos en un mínimo de 2000 eritrocitos maduros por animal. Pueden emplearse sistemas de análisis automatizados (análisis de la imagen o citometría de flujo continuo de suspensiones celulares) en lugar del recuento manual, siempre que estén debidamente justificados y validados (Krishna , 2000; FDA, 2003).

#### **4.3 Ventajas y desventajas del ensayo de micronúcleos**

El incremento en el uso del ensayo de micronúcleos proviene de las ventajas principales como su velocidad de análisis y simplicidad. Sin embargo no son las únicas. Los micronúcleos pueden ser observados durante todo el ciclo celular y el número de células contables es relativamente ilimitado; el parámetro contado es reconocido fácilmente hasta por personal con poca experiencia en citogenética; no se requiere un cariotipo favorable; el micronúcleo formado durante la división celular persiste al menos a través de la siguiente interfase de modo que el tiempo de muestreo es menos crítico; no se requiere el uso de algún otro agente químico además de aquel que está bajo prueba, como por ejemplo, agentes huso bloqueadores necesarios en otras técnicas citogenéticas y la significancia de micronúcleos es comparativamente clara ( Schmid, 1975).

La prueba de micronúcleos en sangre periférica tiene mayores ventajas que la realizada en médula ósea, ya que una pequeña gota de sangre proporciona miles de células contables, se pueden obtener muestras repetidas fácilmente de un

mismo animal, evitando la necesidad de sacrificarlo. La única preparación necesaria consiste en un frotis directamente de sangre.

También es más fácil el conteo en preparaciones de sangre periférica que en las de médula ósea. Los micronúcleos son de fácil distinción porque ellos son los únicos teñidos dentro de una célula anucleada como el eritrocito. Hay también menos cantidad de material basofílico extraño sobre la laminilla que en el caso de médula ósea (Tsuchimoto y Matter, 1979; Hernández, 1996).

La principal limitación del uso de la prueba de micronúcleos para identificar daño citogenético es que no detecta la diferencia entre los agentes que rompen cromosomas de los que causan rezago anafásico (Calderón y Ramírez, 1992).

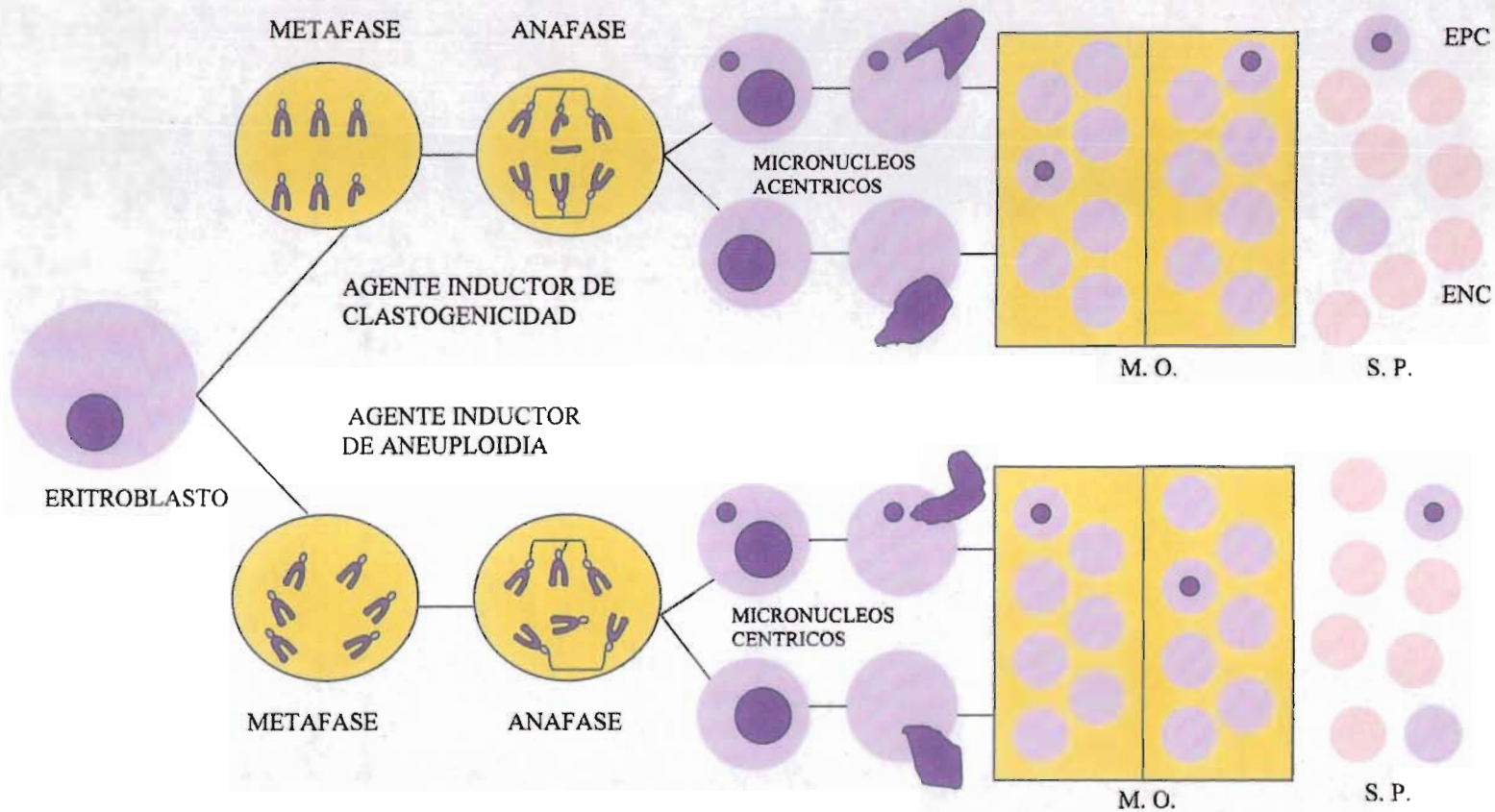


Figura 14.- Representación esquemática del mecanismo de formación de micronúcleos en eritroblastos de médula ósea resultando en la formación de fragmentos cromosómicos acéntricos y/o cromosomas rezagados (Márquez, 2002).

## JUSTIFICACIÓN

La propiedad genoprotectora del extracto de cuachalalate observada en un estudio previo con la prueba de micronúcleos despertó el interés de continuar con otros estudios que caractericen mejor dicha acción, ya que de esto dependerá el posible uso de la planta de cuachalalate como un anticancerígeno.

Dentro de estos estudios se encuentran los relacionados a determinar a los principios activos de los cuales depende la antigenotoxicidad de la corteza de cuachalalate. Por ello en el presente estudio se realizará la evaluación genotóxica de uno de estos componentes que previamente ha mostrado una acción citotóxica. Además el estudio se extiende a un derivado semisintético con el cual se pretende comprobar que modificaciones en la estructura del compuesto alteran su actividad biológica. Los resultados de este estudio permitirán ir caracterizando cada vez mejor las propiedades farmacológicas de esta planta medicinal.

## **OBJETIVOS**

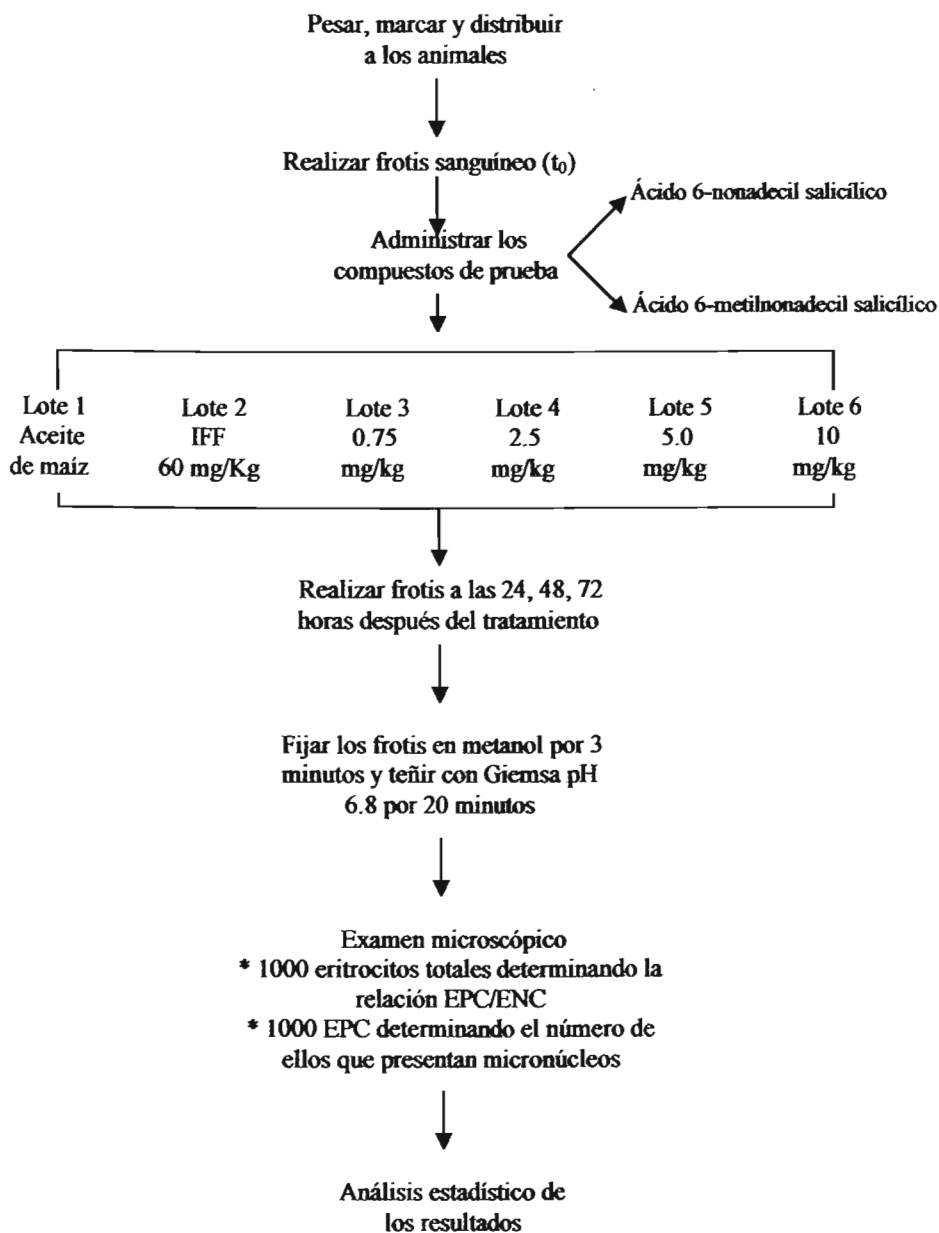
### **GENERAL**

Determinar la actividad genotóxica del ácido 6-nonadecil salicílico y de su éster metílico a diferentes concentraciones en un ensayo in vivo en sangre periférica de ratones CD1 con la prueba de micronúcleos para caracterizar la acción biológica de estos compuestos presentes en cuachalalate.

### **PARTICULARES**

- Determinar la actividad genotóxica mediante la frecuencia de micronúcleos en ratones CD1 tratados a diferentes concentraciones con el ácido 6-nonadecil salicílico y determinar así mismo, la actividad citotóxica por medio del índice de EPC/ENC
- Determinar la actividad genotóxica mediante la frecuencia de micronúcleos en ratones CD1 tratados a diferentes concentraciones con el ácido 6-metilnonadecil salicílico y determinar así mismo, la actividad citotóxica por medio del índice de EPC/ENC
- Comparar el efecto producido por el ácido 6-nonadecil salicílico con el ácido 6-metilnonadecil salicílico tanto en la actividad genotóxica como en la citotóxica

## DIAGRAMA DE FLUJO EXPERIMENTAL





## MATERIAL Y METODOS

El material biológico consistió en 50 ratones macho del bioterio de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala de  $20 \pm 5$  g de peso, de la cepa CD1, los cuales se mantuvieron bajo las mismas condiciones ambientales (temperatura, luz y hábitat) y con libre acceso de agua y alimento durante el desarrollo experimental.

### Procedimiento para el estudio de micronúcleos en eritrocitos policromáticos de sangre periférica:

Se utilizaron 50 ratones CD1 los cuales fueron pesados, marcados y distribuidos conforme a las tablas 4,5 y 6.

Los compuestos que se utilizaron fueron el ácido 6-nonadecil salicílico que es un polvo blanco con punto de fusión de  $50^{\circ}\text{C}$ , soluble en disolventes polares e insoluble en hexano, su fórmula química es  $\text{C}_{26}\text{H}_{47}\text{O}_3$  y su peso molecular es de 407 g/mol y el ácido 6-metilnonadecil salicílico que es un derivado semisintético que se obtuvo de hacer reaccionar al ácido 6-metilnonadecil salicílico con un diazometano y que se presentó como un aceite de color amarillo. Ambos compuestos se disolvieron en aceite de maíz que sirvió como vehículo para su administración.

Tabla 4. Distribución de los lotes para el ácido 6-nonadecil salicílico

Lote	Solución Administrada
1	0.75 mg/kg de ácido 6-nonadecil salicílico
2	2.5 mg/kg de ácido 6-nonadecil salicílico
3	5.0 mg/kg de ácido 6-nonadecil salicílico
4	10.0 mg/kg de ácido 6-nonadecil salicílico

Tabla 5. Distribución de los lotes para el ácido 6-metilnonadecil salicílico

Lote	Solución Administrada
1	0.75 mg/kg de ácido 6-metilnonadecil salicílico
2	2.5 mg/kg de ácido 6-metilnonadecil salicílico
3	5.0 mg/kg de ácido 6-metilnonadecil salicílico
4	10.0 mg/kg de ácido 6-metilnonadecil salicílico

Tabla 6. Distribución de los lotes para los controles

1	Aceite de maíz 0.3 mL (negativo)
2	60 mg/kg ifosfamida (positivo)

Una vez distribuidos se les tomó a todos los animales una muestra de sangre para obtener los frotis del tiempo cero ( $t_0$ ), la primera obtención de éstos se realizó de la siguiente manera:

La primera muestra corresponderá a la basal de micronúcleos. Para esto se tomó una muestra de sangre periférica de ratón obtenida por un corte de la porción terminal de la cola. Se depositó una gota en un portaobjetos previamente desengrasado y limpio. La extensión de la gota se realizó con la ayuda de otro portaobjetos colocado en un ángulo de 45° del primero. Se disminuye el ángulo entre los portaobjetos y con un solo movimiento se corre la gota, el extendido debe ser uniforme. La preparación se seca al aire.

La administración oral del ácido 6-nonadecil salicílico y del ácido 6-metilnonadecil salicílico se realizó mediante una sonda epigástrica metálica adaptada a una

jeringa plástica para insulina. La técnica consiste en sujetar al ratón tomándolo de la piel a la altura del cuello para posteriormente asegurarlo tomando la cola y curvándolo un poco para inmovilizarlo, se coloca en posición vertical y se le introduce la sonda en la cavidad oral hasta llegar al esófago vertiendo el contenido de la jeringa, esto con el fin de evitar pérdidas durante la administración ya que es una dosis única.

A las 24, 48, 72 hrs. postadministración, se realizó un frotis sanguíneo a cada ratón por triplicado.

Las laminillas obtenidas se fijaron con metanol absoluto durante 3 min y se secaron al aire. Se realizó la tinción empleando colorante de Giemsa en buffer fosfatos de pH 6.8 ya que la afinidad química o selectiva que posee nos permite la visualización clara de las células así como de los micronúcleos contenidos en ellas. Para ello cada laminilla de prueba se observará en el microscopio, seleccionando las mejores laminillas. Una vez obtenidas las condiciones óptimas de tinción se procederá a teñir por inmersión en un vaso Copplin.

Las laminillas obtenidas fueron analizadas primero a 40 X por regiones en donde las células estén bien separadas, intactas y perfectamente teñidas. Estas regiones fueron localizadas generalmente en la zona cerrada al final del frotis. Posteriormente las laminillas se observaron con el objetivo de inmersión; el teñido de las células debe de ser rojo a rosa en eritrocitos maduros (normocrómicos) y azulado para las formas inmaduras (policromáticos). Los micronúcleos en los EPC se presentan como cuerpos de inclusión de color azul-violeta, son redondos con un diámetro aproximado de 1/20 a 1/15 del eritrocito, no refringentes.

---

---

**Análisis estadístico**

El procedimiento de rutina consistió en la evaluación de dos parámetros:

- Efecto genotóxico: Cuantificación de 1000 eritrocitos policromáticos por ratón observando cuantos de ellos contienen MN (EPCMN)

$$\text{frecuencia EPC MN} = \frac{\text{EPC MN} \times 1000}{\text{EPC contados}}$$

- Efecto citotóxico: Cuantificar la relación de eritrocitos policromáticos y eritrocitos normocrómicos (EPC/ENC) en 1000 eritrocitos por ratón.

$$\% \text{ EPC} = \frac{\text{EPC} \times 100}{\text{EPC} + \text{ENC}}$$

El análisis estadístico de los resultados se realizó con las pruebas de ANOVA y las de comparaciones múltiples de Tukey-Kramer con un  $\alpha=0.05$  en el programa Instat 2 versión 1993.

## RESULTADOS

En la figura 15 se presentan los resultados de la frecuencia de EPCMN en sangre periférica de ratón en el estudio que se le realizó al ácido 6-nonadecil salicílico. Como se puede observar, el control y los grupos experimentales se mantienen en un intervalo de EPCMN de 0.4 hasta 2.2, estos valores están dentro del número de micronúcleos basales que presenta la cepa CD1 (Calderón y Ramírez, 1992). En el inicio de la experimentación ( $t_0$ ) se observó que los ratones de todos los lotes no presentaban diferencias estadísticamente significativas y se encontraron dentro de un rango de 1.2 a 1.8 MN. A las 24 horas se observó un decremento de EPCMN en la dosis de 10 mg/kg y se mantuvo por debajo de uno. En el tiempo de 48 horas todas las dosis y el control tienen un pequeño decremento. A las 72 horas las dosis usadas se comportan de manera similar como al tiempo 0 y al realizar el análisis de varianza no se encontraron diferencias estadísticamente significativas.

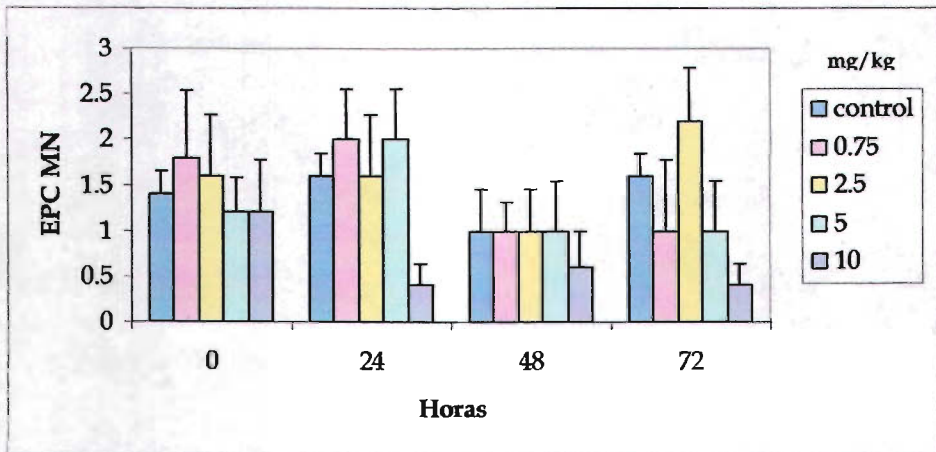


Figura 15. Frecuencia de EPCMN en 1000 EPC en el estudio del ácido 6-nonadecil salicílico. Las barras representan el promedio de EPCMN de 5 animales tratados, y las líneas el error estándar.

No hubo diferencias estadísticamente significativas (ANOVA)  $p < 0.05$ .

En la figura 16 se presentan los resultados de la relación de EPC con respecto a ENC en sangre periférica de ratón para el ácido 6-nonadecil salicílico. Aquí se observó que en el tiempo 0, tanto el control como los grupos experimentales se mantienen en un rango estrecho entre 39 y 51 lo cual indica que no hubo diferencias estadísticamente significativas y que los animales que se encontraban en iguales condiciones. A las 24 horas la única dosis que muestra una disminución en la relación EPC/ENC fue la de 10 mg/kg. En el tiempo de 48 horas las dosis de 0.75, 2.5, 5, 10 mg/kg y el control varían relativamente de forma similar siendo nuevamente la dosis de 10 mg/kg la que muestra diferencias estadísticamente significativas. Y por último los cuatro lotes experimentales a las 72 horas son estadísticamente significativos en comparación con el control a las 0 horas, esto es, se reduce la frecuencia de EPC.

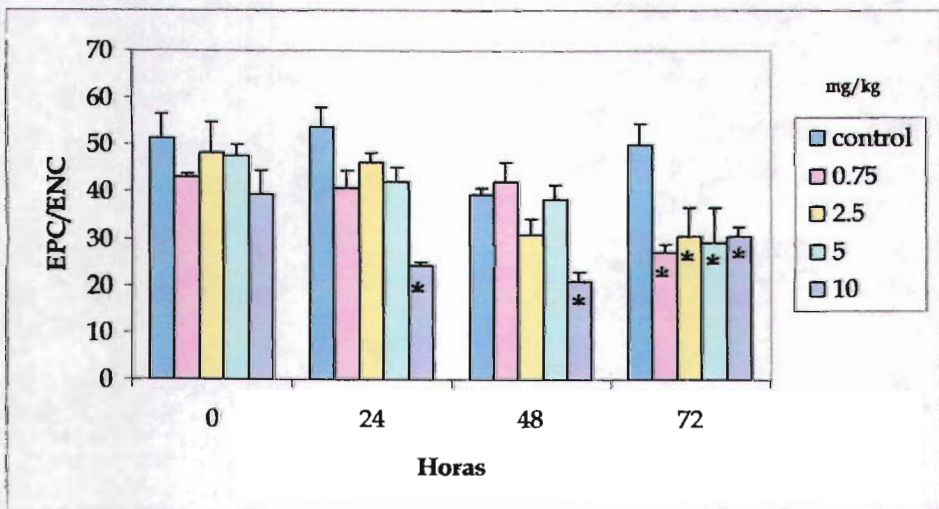


Figura 16. Frecuencia de la relación de eritrocitos policromáticos y eritrocitos normocrómicos (EPC/ENC) en 1000 eritrocitos en el estudio del ácido 6-nonadecil salicílico.

Las barras representan el promedio de EPC/ENC de 5 animales tratados, las líneas representan el error estándar

\* Diferencia estadísticamente significativa con respecto al control negativo  
Prueba de de Tukey-Kramer de comparación múltiple  $p < 0.05$ .

En la figura 17 se presentan los resultados de la frecuencia de EPCMN en sangre periférica de ratón para el estudio realizado al ácido 6-metil nonadecil salicílico. En el tiempo 0, el control tuvo un número mayor de micronúcleos que los grupos experimentales, sin embargo se encuentran dentro del valor de los micronúcleos que presenta la cepa de ratones CD1. A las 24 y 48 horas se observó como el número de micronúcleos va aumentando paulatinamente en los lotes administrados sin alcanzar al control y a las 72 horas las dosis de 0.75, 2.5 y 5 mg/kg se mantienen de manera similar al control mientras que la dosis de 10 no muestran cambios con respecto al control. Al realizar las pruebas estadísticas como el análisis de varianza y la prueba de Tukey-Kramer de comparación múltiple no se encontró variación estadísticamente significativa ni entre el tiempo ni la dosis, ya que todos los valores se encuentran dentro del número de micronúcleos que presenta la cepa CD1.

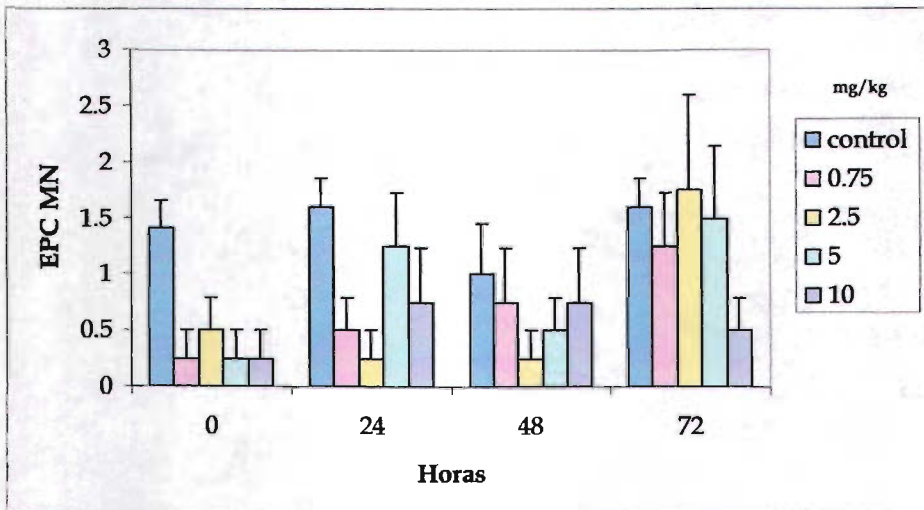


Figura 17. Frecuencia de EPCMN en 1000 EPC en el estudio del ácido 6-metilnonadecil salicílico. Las barras representan el promedio de EPCMN de 5 animales tratados, y las líneas el error estándar. No hubo diferencias estadísticamente significativas (ANOVA)  $p < 0.05$ .

En la figura 18 se presentan los resultados de la relación de EPC con respecto a ENC en sangre periférica de ratón para el ácido 6-metil nonadecil salicílico. Se puede observar como en el tiempo 0 los lotes no presentaron diferencias estadísticamente significativas. En el tiempo de 24 horas los grupos experimentales tienen un decremento siendo la dosis de 10 mg/kg la que presentó el decremento estadísticamente significativo. A las 48 horas se observó como el control tiene un decremento en comparación con la dosis de 0.75 que presentó un incremento. En el tiempo de 72 horas el control y las dosis de 2.5, 5 y 10 tienen un incremento. Al realizar el análisis de varianza y la prueba de Tukey-Kramer de comparación múltiple se encontró que sólo a las 24 horas con la dosis de 10 mg/kg hay diferencias estadísticamente significativas con respecto al control.

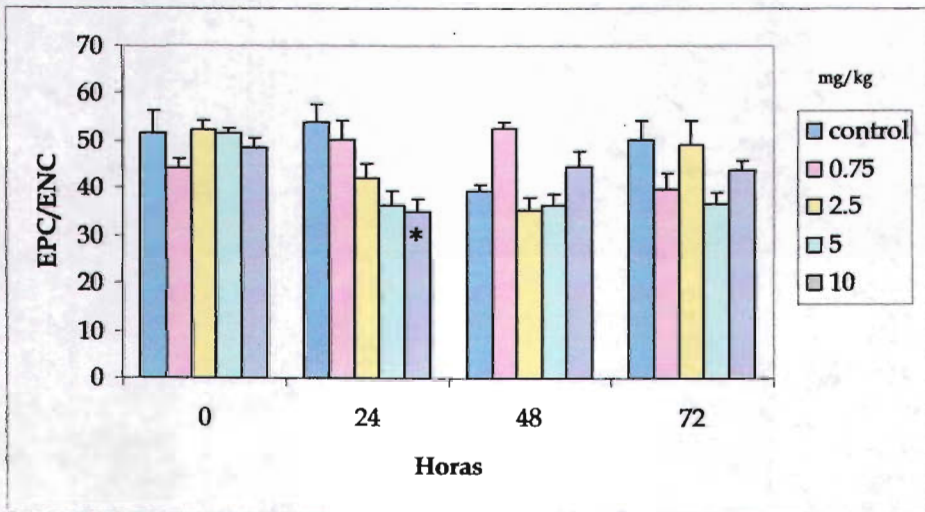


Figura 18. Frecuencia de la relación de eritrocitos policromáticos y eritrocitos normocrómicos (EPC/ENC) en 1000 eritrocitos en el estudio del ácido 6-metil nonadecil salicílico. Las barras representan el promedio de EPC/ENC de 5 animales tratados, y las líneas el error estándar

\* Diferencia estadísticamente significativa con respecto al control negativo  
Prueba de de Tukey-Kramer de comparación múltiple  $p < 0.05$ .



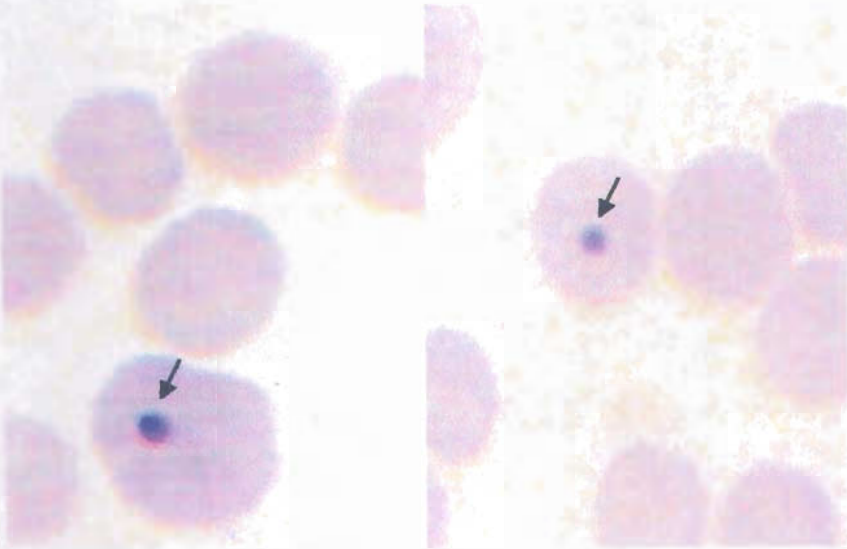


Figura 19. La flecha señala MN en EPC característicos encontrados en el control positivo

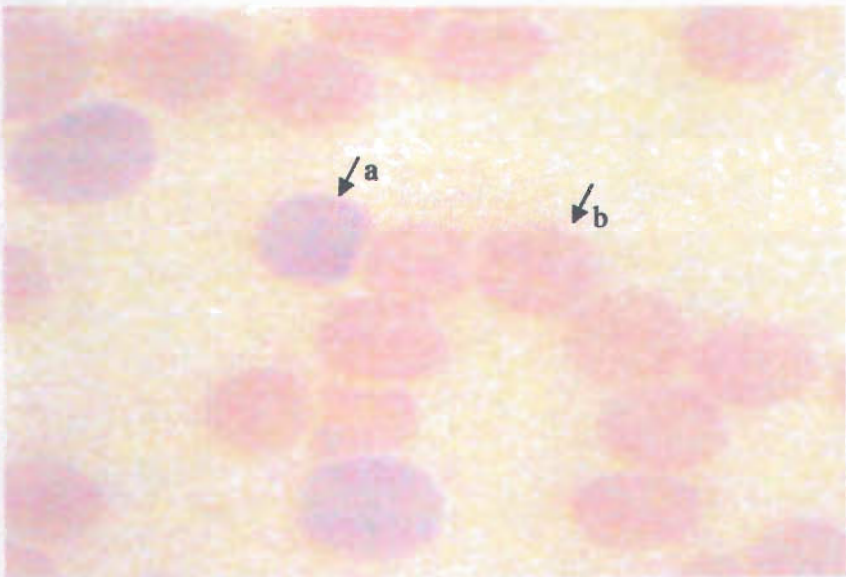


Figura 20. La flecha (a) señala EPC y la flecha (b) señala ENC

---

---

## DISCUSIÓN

El valor de las plantas medicinales está dado por sus constituyentes químicos, generalmente los metabolitos secundarios como los alcaloides, terpenoides, glicósidos, flavonoides y lignanos que producen efectos fisiológicos. El inventario químico y la evaluación farmacológica de las plantas medicinales mexicanas son todavía más incompletos que el inventario taxonómico (Rosas, 2000).

La mayoría de los trabajos reportados en la literatura utilizan al cuachalalate como extracto ya sea acuoso, metanólico o hexánico. Pocos artículos han reportado el efecto farmacológico o toxicológico de los metabolitos que se pueden extraer del cuachalalate.

En el presente trabajo se desarrolló una investigación sobre el efecto genotóxico y citotóxico de uno de los metabolitos extraídos del cuachalalate, el ácido 6-nonadecil salicílico y de su éster metílico obtenido por síntesis química.

El ácido 6-nonadecil salicílico es uno de los ácidos anacárdicos extraídos recientemente del cuachalalate, ésta fue una de las razones por la cual el cuachalalate ahora pertenece a la familia de las Anacardiaceas (Missouri, 2004). La biosíntesis de los ácidos anacárdicos no ha sido descrita en su totalidad, pero en la actualidad se sabe que los ácidos anacárdicos derivan de los ácidos grasos (Tyman, 1979).

Las dosis a las que se expusieron los animales en el presente estudio se designaron tomando en consideración por un lado, el contenido de ácidos anacárdicos presente en el extracto de cuachalalate y por otro el estudio preliminar sobre la citotoxicidad de estos compuestos realizado por Rosas y colaboradores en el 2004 (ver más adelante).

---

La evaluación de la técnica de micronúcleos en sangre periférica de ratones CD1 se efectuó para determinar la capacidad genotóxica y citotóxica del ácido 6-nonadecil salicílico, los resultados demostraron que la frecuencia de EPC MN no mostró diferencias estadísticamente significativas con respecto al control negativo, lo que sugiere que el compuesto no es genotóxico.

Tanto el control como los grupos experimentales se mantuvieron dentro de los valores de EPC MN de la cepa utilizada que son de 1 a 3 MN. En la dosis más grande que es la de 10 mg/kg observamos un comportamiento muy singular ya que a partir de las 24 horas hay una disminución notoria con respecto al control negativo y se mantiene entre 0.4 -0.6 EPC MN. Por consecuencia, esto implica que el ácido 6- nonadecil salicílico es un compuesto que no ocasiona daño al material genético.

Estos resultados son congruentes con los reportados por Martínez y Flores (2003) quienes evaluaron la genotoxicidad del extracto hexánico del cuachalalate con la prueba de micronúcleos en un modelo similar al presente y concluyeron que el extracto no es genotóxico a dosis hasta 1500 mg/kg vía oral ya que no se incrementó la frecuencia de EPC MN.

Con respecto a la citotoxicidad, ésta se evaluó cuantificando la relación de EPC/ENC. El ácido 6- nonadecil salicílico presentó diferencias estadísticamente significativas con respecto al control negativo observando particularmente que la dosis mayor que fue la de 10 mg/kg. Esta presenta en los tres tiempos una disminución estadísticamente significativas con respecto al control en la relación de EPC/ENC ya que se mantiene en un intervalo de 21-30. Con ello podemos decir que la dosis con la mayor cantidad de ácido 6-nonadecil salicílico fue citotóxica, esto no coincide con lo reportado por Martínez y Flores (2003) quienes concluyeron que el extracto hexánico *per se* no es citotóxico, sin embargo hay que

---

mencionar que la mezcla de ácidos anacárdicos que se encuentran en el extracto es muy pequeña comparada con los demás compuestos que contiene el cuachalate, por ejemplo el extracto hexánico contiene un 23.14% de la mezcla de ácidos anacárdicos y de esta el ácido 6-nonadecil salicílico se encuentra en un 2.6% lo que nos dice que la cantidad presente de este ácido es muy pequeña.

Por otro lado la citotoxicidad del ácido 6-nonadecil salicílico solo y en las concentraciones usadas, coincide con el estudio in vitro realizado por Rosas y Soto (Rosas et al, 2004) donde demostraron un efecto citotóxico muy importante de este ácido anacárdico usando dosis que van de 2 hasta 6 mg/ml en diferentes líneas celulares cancerígenas. Los resultados a las 72 horas muestran que las cuatro dosis presentan diferencias estadísticamente significativas ya que tienen un decremento en la relación de EPC/ENC muy similar y significativo con respecto al control negativo, esto nos dice que la citotoxicidad está en función del tiempo ya que a partir de las 72 horas todas las dosis muestran un efecto citotóxico que se puede corroborar con el estudio in vitro de Rosas y colaboradores donde a partir de 2 mg/ml se observa el efecto citotóxico. Como se puede observar la dosis que presentó más diferencias estadísticamente es la de 10 mg/kg. En esta dosis podemos asociar el hecho de que al disminuir el número de micronúcleos y de igual forma la relación EPC/ENC se puede pensar que el posible efecto que está ejerciendo el compuesto es citostático ya que para poder observar EPC MN las células se tienen que dividir y por tanto al ver disminuída la relación de EPC/ENC nos podría indicar una posible supresión de la eritropoyesis.

Una posible explicación para el efecto que ejerce la dosis de 10 mg/kg, sería relacionando los resultados obtenidos con lo reportado por Chen y colaboradores (1998), donde señalan que los ácidos anacárdicos inhiben a la ADN polimerasa  $\beta$ . Como sabemos esta enzima es utilizada en la reparación de ADN, al inhibirla la célula no podría reparar los daño producidos por algunos compuestos y la células terminaría por morir.

Para el ácido 6-metil nonadecil salicílico se encontró que éste, al igual que su precursor, no es genotóxico, ya que no mostró diferencias estadísticamente significativas con respecto al control negativo. Aquí cabe mencionar que los valores de EPCMN que se encuentran dentro de un intervalo de 1 -1.6 EPCMN del control se encuentran un poco más elevados que las dosis usadas que se encuentran en un intervalo de 0.25 - 1.75, esto se puede deber a que en la experimentación se manejaron por separado, inicialmente los lotes que corresponden al ácido 6- nonadecil salicílico y el control negativo y posteriormente los lotes del ácido 6- metilnonadecil salicílico, sin embargo no hay que pasar por alto que tanto el control como el ácido 6- metil nonadecil salicílico se mantienen en el rango normal de EPC MN que presenta la cepa usada y que esta diferencia se pudo deber únicamente a las distintas camadas de ratones utilizadas y no a la actividad del compuesto o del control, lo que es corroborado estadísticamente con las pruebas utilizadas.

Con respecto a la citotoxicidad del ácido 6-metilnonadecil salicílico se encontró que solo tiene diferencias estadísticamente significativas en la relación de EPC/ENC en la dosis de 10 mg/kg a las 24 horas lo cual no refleja un efecto citotóxico importante. Mientras que las demás dosis a los diferentes tiempos se comportan de manera muy similar al control negativo y esto se podría relacionar con el trabajo realizado por Navarrete y colaboradores (1989) donde aíslan del cuachalalate una mezcla de ácidos anacárdicos pero en forma de ésteres metílicos y estos no presentan toxicidad sobre un organismo acuático muy sensible, como lo es *Artemia salina* ( $LC_{50} > 1000 \text{ ppm}$ ).

En cuanto a la comparación de los efectos producidos por el ácido 6-nonadecil salicílico y su éster metílico podemos decir que ambos compuestos no presentaron diferencias estadísticamente significativas en la frecuencia de EPC MN lo que nos dice que no son genotóxicos. Por otro lado se esperaba que el ácido 6-

metilnonadecil salicílico, el cual tiene una modificación química con respecto al ácido 6-nonadecil salicílico no mostrara acción citotóxica por las razones anteriormente expuestas y esto se comprobó ya que no hubo diferencia estadísticamente significativas con respecto al control en la relación de EPC/ENC por lo tanto es un compuesto que no presenta citotoxicidad a diferencia del ácido 6-nonadecil salicílico que sí fue citotóxico.

Con todo esto podemos decir que el ácido 6-nonadecil salicílico es un compuesto que se podría perfilar como un auxiliar en el tratamiento de cáncer, ya que no es genotóxico y presenta una citotoxicidad en la dosis de 10mg/Kg. Es importante que en el futuro se sigan realizando estudios de este ácido para poder determinar el mecanismo de citotoxicidad por el cual actúa. Además de seguir en la investigación de los compuestos del cuachalalate para poder conocer sus propiedades así como el efecto que producen cada uno de ellos y poder determinar de una forma más eficaz y precisa cuales son los metabolitos que poseen la actividad anticancerígena ya sea de forma individual o en conjunto.

## CONCLUSIONES

El ácido 6 -nonadecil salicílico no incrementó la frecuencia de EPC MN a las dosis de 0.75, 2.5, 5, 10 mg/kg, lo que indica que este ácido no es genotóxico.

En la relación de EPC / ENC se obtuvo una disminución a partir de las 24 horas en la dosis de 10 mg/kg y posteriormente a las 72 horas en las cuatro dosis lo que nos indica que el ácido 6-nonadecil salicílico resultó ser un compuesto citotóxico dependiente del tiempo y la dosis.

El ácido 6-metilnonadecil salicílico no es un compuesto genotóxico, ya que no incrementó la frecuencia de EPC MN a las dosis de 0.75, 2.5, 5, 10 mg/kg.

El ácido 6-metilnonadecil salicílico no es un compuesto citotóxico, ya que no alteró la relación de EPC /ENC a las dosis de 0.75, 2.5, 5, 10 mg/kg.

En la comparación de los dos compuestos se puede decir que ninguno de los dos es genotóxico y que el ácido 6-nonadecil salicílico es un compuesto citotóxico a diferencia de su éster metílico.

---

---

**LITERATURA CITADA**

- Arroyo R., G. 1996. Estudio de las propiedades fotoprotectoras - cosméticas del extracto de *Amphiterygium adstringens* (cuachalalate). Tesis de licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. UNAM. México.
- Azcón B., J. y Talón, M. 2000. Fundamentos de fisiología vegetal. Editorial Interamericana. España. Pag. 261-283
- Benítez Y., J: 1998. Evaluación farmacológica del efecto gastroprotector de los triterpenoides de la corteza de cuachalalate. Tesis de licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza. UNAM. México.
- Calderón, M. E. y H. L. Ramírez, 1992. Efecto mutagénico inducido por capsaicina sobre eritrocitos policromáticos de sangre periférica detectado mediante la prueba de micronúcleos en un estudio subagudo in vivo. Tesis de Licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlan. UNAM. México.
- Chen, J., Y. Zhang, L. Wang, S. Sucheck, A. Snow, S. Hech, 1998. Inhibitors of DNA polymerase  $\beta$  from *Schoepfia Californica*. Chem, Commun. 2769-2770
- Dominguez, X. A.; Franco, R.; Garcia, S.; Porras, M. E.; Vazquez, G.; Amezcua, B. 1983. Mexican medicinal plants. XLVIII. Structure of instipolinacic acid isolated from the bark of the cuachalalate (*Amphyterygium adstringens* schl.). Revista Latinoamericana de Química. 14(2): 99-100
- Fernández, R. J. 2003. Valoración del efecto cicatrizante del cuachalalate (*Amphypterygium adstringens*) en lesiones cutáneas de rata wistar. Tesis de licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza. UNAM. México.



Fenech, M. 2000. The in vitro micronucleus technique. *Mutation Research* (455): 81-95

Food and Drug Administration (FDA), Toxicological principles for the safety assessment of food ingredients. 2003. Mammalian erythrocyte micronucleus test. Disponible en. [Http://www.fda.gov/](http://www.fda.gov/) (Revisado el 3 de Mayo del 2004)

González E. y J. Delgado. 1962. Phytochemical investigation of *Amphipterygium adstringens*. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 51-8:786-790.

González E., McKenna, G., Delgado, J. 1962. Anticancer evaluation of *Amphipterygium adstringens*. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 51-9: 901-903.

Hayashi, M., J. Macgregor, D. Gatehouse, I. Adler, D. Blakey, S. Dertinger, G. Krishna, T. Morita, A. Russo, And S. Sutou. 2000. In vivo Rodent Erythrocyte Micronucleus Assay. II. Some Aspects Of Protocol Design Including Repeated Treatments, Integration With Toxicity Testing, And Automated Scoring. *Environmental And Molecular Mutagenesis*. (35): 234-252

Herbolaria en México. 2004. Disponible en. [www.plantasmedicinales.com.mx/herbolaria.html](http://www.plantasmedicinales.com.mx/herbolaria.html) (Revisado el 27 Octubre del 2004)

Hernández, C., A. 1996. Efecto anticlastogénico de la clorofilina en contra del nitrito de sodio evaluado en ratones cepa NIH. Tesis profesional Facultad de Estudios Superiores Cuautitlan-UNAM.

- Hoffmann D. 1992. Manual holístico de la hierbas medicinales. Editorial Plural. España. pag 9-27, 143.
- Huerta, Carlos, La Herbolaria: mito o realidad. 2002. Disponible en. [http://www.conabio.gob.mx:8000/institucion/conabio\\_espanol/doctos/huerta.html](http://www.conabio.gob.mx:8000/institucion/conabio_espanol/doctos/huerta.html) (Revisado el 27 Octubre del 2004)
- Itokawa, H., Totsuka, N., Nakahara, K., Maezuru, M., Takeya, K., Kondo, M., Inamatsu, M., Morita, H. 1989. A quantitative structure-activity relationship for antitumor activity of long-chain phenols from *Ginkgo biloba* L. Chemical Pharmaceutica Bulletin 37(6): 1619-1621
- Itokawa, H., Totsuka, N., Nakahara, K., Takeya, K., Lepoittevin, J., Asakawa, Y. 1987. Antitumor Principles from *Ginkgo Biloba* L. Chem. Pharm. Bull. 35(7) 3016-3020
- Juscafresa, B. 1995. Guía de la flora medicinal. Editorial AEDOS. España. pag 9- 10.
- Kirsch-Volders., M. A. Elhajouji, E. Cundari, P. Van Hummelen. 1997. The in vitro micronucleus test: a multi-endpoint assay to detect simultaneously mitotic delay, apoptosis, chromosome breakage, chromosome loss and non-disjunction. Mutation Research (392): 19-30
- Krishna, G., Hayashi, M. 2000. In vivo rodent micronucleus assay: protocol, conduct and data interpretation. Mutation Research 455: 155-166
- Kubo, I., H. Muroi, and M. Himejima. 1993-a. Structure-antibacterial activity relationships of anacardic acids. Journal of Agricultural Food Chemistry. (41): 1016-1019

- Kubo, I., M. Ochi, P. Vieira and S. Komatsu. 1993-b. Antitumor Agents From The Cashew (*Anacardium Occidentale*) Apple Juice . Journal of Agricultural Food Chemistry (41): 1012-1015
- Kuklinsk, C. 2000. Farmacognosia. Editorial Omega. Barcelona. pag. 371-379
- Maldonado, R. 1985. Los productos de las plantas una visión integral. Editorial Interamericana. México. pag. 137-150
- Mata, R.; Calzada, F.; Navarrete, A.; Del Rio, F.; Delgado, G. 1991. Long-chain phenols from the bark of *amphipterygium adstringens*. Journal of Ethnopharmacology. 34(2-3): 147-54.
- Martínez M. 1967. Las plantas medicinales de México. 6ª edición. Editorial Botas. México. pag 404.
- Martínez, R. E., Flores, R. G. 2003. Estudio de la acción anticlastogénica del cuachalalate (*Amphipterygium Adstringes*) sobre la inducción de micronúcleos producidos por ifosfamida. Tesis de Licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlan. UNAM. México.
- Márquez, B. M. P., 2002. Actividad genotóxica de cuatro derivados carbámicos en ratón y análisis de la relación de dicho efecto con su estructura química. Tesis de Maestría. Escuela Nacional de Ciencias biológicas, IPN.
- Masuoka, N., Kubo, I. 2003. Characterization of xanthine oxidase inhibition by anacardic acids. Biochimica et Biophysica Acta. 1688:245-249.

- Miranda, F., V., Manelle-Oliveira, R., Machado-Santelli, G., M. 2004. Using fluorescente for improvement of the quantitative analysis of micronucleus in cell cultura. Mutation Research Article in press.
- Missouri Botanical Garden, *Amphipterygium adstringens* (Schltdl.) Standl. 2004. Contributions from the United States National Herbarium 23: 672. 1923. Disponible en. <http://www.mobot.org/> (Revisado el 16 de Diciembre del 2004)
- Muroi, H., Nihei, K., Tsujimoto, K., Kubo I. 2004. Synergistic effects of anacardic acids and methicillin against methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. Bioorganic Medicinal Chemistry. (12); 583-587.
- Navarrete, A.; Martínez-Uribe, L. S.; Reyes, B. 1998. Gastroprotective Activity Of The Stem Bark Of *Amphipterygium Adstringens* In Rats. Phytotherapy Research. 12(1): 1-4.
- Navarrete, A.; Mata, R.; Delgado, G. 1989. Chemical studies of mexican plants used in traditional medicine. Part IX. Alkylanacardic acids from *Amphipterygium Adstringens*. Planta Medica. 55(6): 579.
- Navarrete C., A. 1982. Estudio químico y pruebas farmacológicas a la corteza de *Juliana adstringens*. Tesis de Licenciatura. Escuela Nacional de Estudios Profesionales Zaragoza. UNAM. México.
- Olivera, A.G., M. Soto, M. Martínez, T. Terrazas, F. Solares. 1999. Phytochemical study of cuachalalate (*Amphiptherygium Adstringes*, Schiede ex Schlecht) Journal of Ethnophaymacology. (68):109-113

- Ortiz, S, A. Cuachalalate. 2004. Disponible en. [http://www.cib.uaem.mx/agehd/bol\\_junio\\_julio2004.ht](http://www.cib.uaem.mx/agehd/bol_junio_julio2004.ht) (Revisado el 16 Diciembre del 2004)
- Oviedo-Chávez, I. Ramírez-Apan, M. Soto-Hernández, M. Martínez-Vázquez. 2004. Principles of the bark of *Amphipterygium adstringens* (Julianaceae) with anti-inflammatory activity. *Phytomedicine*. 11:436-445.
- Plantas Medicinales. 2004. Disponible en. <http://www.plantas-medicinales.org/datenbank.php>. (Revisado el 23 de Octubre del 2004)
- Paramashivappa. R., P. Phani Kumar, P. J. Vithayathil, and A. Srinivasa Rao. 2001. Novel method for isolation of major phenolic constituents from cashew (*Anacardium occidentale L.*) Nut shell liquid. *Journal Agriculture Food Chemistry*. (49): 2548-2551
- Rea, Angela., Schmidt, J., Setter, W., Sibanda, S., Taylor, C., Gwebu, E. 2003. Cytotoxic activity of *Ozoroa insignis* from Zimbabwe. *phytoterapia*. 74:732-735.
- Rosas A., H. 2000. Análisis fitoquímico de *Cyrtocarpa procera H.B.K. y Amphipterygium adstringens* Schiede ex Schlecht. Tesis de Maestría Instituto de Recursos Naturales Colegio de Postgraduados, Chapingo, México.
- Rosas A., H., Martínez M. y Soto M. 2004. Phytochemistry and biological activity of *Amphipterygium adstringes* Schiede ex Schlecht. Memorias del congreso Future Trends in phytochemistry: A Young Scientists Symposium. Celebrado en Gargnano, Italia del 05 al 08 de mayo.

- Salamone, M., Heddle, J., Stuart, E., Katz, M. 1980. Studies on 3 model agents, mitomycin C, cyclophosphamide and dimethylbenzanthracene. *Mutation Research*. 74: 347-356.
- Salisbury, B., F. 1994. *Fisiología Vegetal*. Editorial Iberoamericana. México. pag 339.
- Schmid, W. 1975. The micronucleus test. *Mutation Research*. (31) 9-13.
- Solares, F., Gálvez, C., 2002. Manual para una producción sustentable de corteza de cuachalalate (*Amphipterygium adstringes* Schiede ex Schlecht). Publicación Especial No. 34, CIR Centro. Pp. 13
- Speit, G., Henderson, L. 2004. Review of the in vivo genotoxicity tests performed with styrene. *Mutation Research Article in press*.
- Toyumizu, M., Okamoto, K., Ishibashi, T., Chen, Z., Nakatsu, T. 2000. Uncoupling effect of anacardic acids from cashew nut shell oil on oxidative phosphorylation of rat liver mitochondria. *Life Sciences*. 66(3):229-234.
- Tsuchimoto, T., Matter, B. 1979. In vivo cytogenetic screening methods for mutagens, with special reference in the micronucleus test. *Arch. Toxicol.* 42: 239-248.
- Tyman, S. 1979. Non-opsoprenoid long chain phenols. *Chemical Society Review*. 8: 494-537.
- Valencia, O, C. 1995. *Fundamentos de fitoquímica*. Editorial Trillas, México, 1995, pag. 11-175

Watson, W.H., Domínguez, X.A. Vázquez, G., García, S. 1987. Cuachalalic acid, a new triterpene from *Amphipterygium adstringens*. Revista Latinoamericana de Química. 18, 89-90.

Wolf, P., Leupke, N., P. 1997. Formation of micronuclei in incubated hens at measure of genotoxicity. Mutation Research. 394:163-175.

Zamora T., P. 2003. Evaluación del aprovechamiento potencial del cuachalalate (*Amphipterygium Adstringes*, Schiede ex Schlecht) en San Juan Bautista Jayacatlan Oaxaca. Tesis profesional. Facultad de ciencias-UNAM, México.