



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO**

---

**INSTITUTO DE CIENCIAS DE LA SALUD  
ÁREA ACADÉMICA DE NUTRICIÓN**

**Evaluación de la genotoxicidad  
de las raíces de *Heliopsis longipes* S.F. Blake mediante  
la técnica de micronúcleos en ratón CD1<sup>+</sup>**

**T E S I S**

Para obtener el título de  
**Licenciada en Nutrición**

**P R E S E N T A**

**Lorena Rivera Garnica**

Bajo la Dirección de:

**Dra. Raquel Cariño Cortés**



Pachuca, Hgo., Febrero 2010.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO  
INSTITUTO DE CIENCIAS DE LA SALUD  
ÁREA ACADÉMICA DE NUTRICIÓN



De acuerdo con el artículo 134 del Reglamento de Control Escolar vigente, el jurado de examen recepcional designado, autoriza para su impresión la Tesis titulada

**“Evaluación de la Genotoxicidad de las Raíces de *Heliopsis longipes* S.F. Blake Mediante la Técnica de Micronúcleos en Ratón CD1<sup>+</sup>”**

Que para obtener el Título de Licenciado de Nutrición sustenta la Pasante

**C. Lorena Rivera Garnica**

**ATENTAMENTE**  
**Pachuca, Hidalgo, 10 de Diciembre del 2009**  
**“Amor, Orden y Progreso”**

PRESIDENTE	QFB. ZURISSADAI BETANZOS PALMEROS
SECRETARIO	DR. LUIS DELGADO OLIVARES
PRIMER VOCAL	DR. JORGE ALBERTO MENDOZA PÉREZ
SEGUNDO VOCAL	DR. EDUARDO OSIRIS MADRIGAL SANTILLÁN
TERCER VOCAL	DRA. RAQUEL CARIÑO CORTÉS
PRIMER SUPLENTE	DRA. MARÍA TERESA SUMAYA MARTÍNEZ
SEGUNDO SUPLENTE	DR. ERNESTO ALANÍS GARCÍA

El presente trabajo de investigación fue desarrollado en el Bioterio del Instituto de Ciencias de la Salud de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, bajo la dirección de la Dra. Raquel Cariño Cortés.

## AGRADECIMIENTOS

*Agradezco a Dios, a la vida, al amor y a la naturaleza  
por ser elementos indispensables para la existencia humana y por permitirme concluir  
uno de los objetivos principales de mi vida... ¡¡GRACIAS!!!*

***A mi querida directora de tesis:***

*Dra. Raquel gracias por su apoyo, paciencia, confianza y por ser además de mi asesora una excelente amiga, que Dios la bendiga.*

***A mis sinodales:***

*Por su conocimiento y sus valiosas aportaciones para mejorar este trabajo.*

***A mis compañeras de laboratorio:***

*Fabis, Laura, Mari, Kary y Anita; por su linda amistad y por acompañarme a lo largo de esta investigación, las quiero mucho.*

***A todo el equipo del Bioterio:***

*Al Doctor Ramón, Bárbara, Alejandro y Sr. Manuel, por su paciencia y apoyo.*

***A mis ratoncitos de laboratorio:***

*Por ser unas criaturitas extraordinarias, además de componentes indispensables en la elaboración de este trabajo y en la búsqueda de mayores conocimientos para aportar a la ciencia.*

### ***A mi padre:***

*Por los bellos recuerdos que guardo de ti, por tu enseñanza, por tu apoyo y confianza que me tuviste siempre, porque sé que donde quiera que estés, te sentirás orgulloso de mi, este trabajo te lo dedico a ti con todo mi amor papá.*

### ***A mi mamá:***

*Por estar conmigo siempre, por apoyarme, por ser mi amiga y compañera, te amo mamá.*

### ***A mi tío Cruz:***

*Por su apoyo, confianza y amor.*

### ***A mis hermanos y hermanas:***

*Toñis por ser mi ángel siempre, por tu apoyo, consejos y enseñanza, por ser un ejemplo para mí.*

*Ise, por ser una segunda mamá para mí, por escucharme, por estar y confiar en mí.*

*Chivis, por ser otra hermana más para mí, gracias por tu apoyo, confianza y compañía, te quiero.*

*Güero y Oscar; Por ser unos hermanos para mí, por sus consejos y confianza que siempre me han demostrado.*

***A mis hermosos sobrinos:***

*Paco, Luis, Aureo y Ray; porque en todo momento muestran esa energía, esa alegría contagiosa y esa mirada que me llena de paz y esperanza, lo quiero mucho.*

***A Gilberto:***

*Por ser mi compañero, mi amigo y mi amor, por apoyarme y tenerme paciencia y sobre todo por hacerme soñar despierta, te amo.*

***A mis queridas pajitas:***

*Josh, Jess y Arianna; por ser mis amigos y colegas, por la amistad sincera que nos ha unido desde que nos encontramos en este camino, por estar conmigo en los más bellos y difíciles momentos.*

***A mis amigos alter:***

*Sara, Carlos y Mar; por los agradables momentos compartidos, por su compañía y amistad.*

***A mis gatitos:***

*Por enseñarme día a día lo más pequeño, sencillo y maravilloso de la vida.*

***A ti Lore por tener fe y confianza en ti misma para poder llegar a esta meta.***

***A todos y todas ustedes por ser parte de mi vida...***

***Lore***

<b>ÍNDICE GENERAL</b>	<b>I</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b>	<b>III</b>
<b>ÍNDICE DE CUADROS</b>	<b>IV</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b>	<b>V</b>
<b>RESUMEN</b>	<b>VI</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>VII</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
1.1 Especies vegetales comestibles	1
1.2 Intoxicación alimentaria	4
1.3 Componentes genotóxicos en los alimentos	6
1.4 Genotoxicidad	8
1.5 Prueba de micronúcleos	10
1.6 Estudios genotoxicos de productos vegetales	11
1.7 Mutación y carcinogénesis	12
1.8 Daunorubicina	15
1.8.1 Mecanismos de acción	16
1.9 <i>Heliopsis</i>	17
1.10 <i>Heliopsis longipes</i>	19
1.10.1 Generalidades	19
1.10.2 Localización	19
1.10.3 Usos tradicionales	21
1.10.4 Antecedentes experimentales	21
1.11 Alcamidas	22
<b>2. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN</b>	<b>24</b>

<b>3. JUSTIFICACIÓN</b>	24
<b>4. OBJETIVOS</b>	25
<b>5. HIPOTESIS</b>	26
<b>6. METODOLOGÍA</b>	26
6.1 Obtención del extracto de <i>Heliopsis longipes</i>	27
6.2 Animales	27
6.3 Reactivos	28
6.4 Aparatos y equipo	28
6.5 Determinación de la DL <sub>50</sub>	29
6.6 Evaluación de la genotoxicidad mediante la técnica de micronúcleos	30
6.7 Análisis Estadístico	31
<b>7. RESULTADOS</b>	32
<b>8. DISCUSIÓN</b>	34
<b>9. CONCLUSIONES</b>	37
<b>10. RECOMENDACIONES</b>	37
<b>11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	38
<b>12. ANEXOS</b>	44

<b>Figura 1.</b> Estructura química de la Daunorubicina.	15
<b>Figura 2.</b> Mecanismos de activación de la Daunorubicina.	16
<b>Figura 3.</b> Arbusto de <i>Heliopsis longipes</i> y forma de comercialización de las raíces de <i>Heliopsis longipes</i> .	19
<b>Figura 4.</b> Localización geográfica de <i>Heliopsis longipes</i> .	20
<b>Figura 5.</b> Presentaciones de venta del chilcuague.	20
<b>Figura 6.</b> Chilcuague.	21
<b>Figura 7.</b> Estructura química de la afinina.	22

## INDICE DE CUADROS

<b>Cuadro 1.</b> Sustancias dañinas que pueden ser ingeridas a través de los alimentos.	5
<b>Cuadro 2.</b> Presencia de agentes tóxicos en alimentos.	7
<b>Cuadro 3.</b> Sistemas de prueba para identificar agentes mutagénicos.	9
<b>Cuadro 4.</b> Tipos de mutágenos.	11
<b>Cuadro 5.</b> Tipos de mutaciones que se producen en el ADN debido a la naturaleza del agente.	13
<b>Cuadro 6.</b> Distribución de especies conocidas de <i>Heliopsis</i> .	18
<b>Cuadro 7.</b> Esquema del diseño experimental.	26
<b>Cuadro 8.</b> Determinación de la dosis letal media (DL <sub>50</sub> ).	30
<b>Cuadro 9.</b> Distribución de los lotes para el ensayo genotóxico.	31
<b>Cuadro 10.</b> Evaluación genotóxica de <i>Heliopsis longipes</i> (HL).	32
<b>Cuadro 11.</b> Efecto de la administración de las raíces de <i>Heliopsis longipes</i> (HL) sobre la citotoxicidad en sangre periférica de ratón.	33

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>ADN</b>	Ácido Desoxirribonucleico
<b>ARN</b>	Ácido Ribonucleico
<b>BC</b>	$\beta$ -cariofileno
<b>CO<sub>2</sub></b>	Bióxido de carbono
<b>Dau</b>	Daunorubicina
<b>DL<sub>50</sub></b>	Dosis letal media
<b>EEC</b>	European Economic Community
<b>EN</b>	Eritrocitos normocrómicos
<b>EP</b>	Eritrocitos Policromáticos
<b>EPMN</b>	Eritrocitos Policromáticos Micronucleados
<b>ERO</b>	Especies Reactivas de Oxígeno
<b>ETA</b>	Enfermedades Transmitidas por los Alimentos
<b>FDA</b>	Food and Drug Administration
<b>GABA</b>	Ácido gamma-aminobutírico
<b>HL</b>	<i>Heliopsis longipes</i>
<b>MN</b>	Micronúcleos
<b>OECD</b>	Organization for Economic Cooperation and Development
<b>RL</b>	Radicales Libres
<b>SS</b>	Solución Salina

*Heliopsis longipes* S.F. Blake (HL) (Asteraceae), conocida comúnmente como “chilcuague” es una planta nativa de México, se localiza principalmente en la región conformada por porciones de la Sierra de Álvarez y la Sierra Gorda, donde coinciden parte de los estados de San Luis Potosí, Guanajuato y Querétaro. HL es utilizada tradicionalmente por la población debido a que posee propiedades anestésicas, antiparasitarias e insecticidas, así como condimento, debido a que resalta el sabor y picor de platillos típicos en la región. Existen pocos estudios realizados a esta planta, y hasta el momento no hay datos que refieran la toxicidad del extracto, por lo cual el objetivo de este estudio fue evaluar la genotoxicidad de las raíces de HL mediante la técnica de micronúcleos. La secuencia de este trabajo fue la siguiente: 1) se obtuvo el extracto etanólico de las raíces de *Heliopsis longipes* mediante extracción Soxhlet, 2) se determinó la toxicidad aguda del extracto etanólico de las raíces de HL en ratón, 3) se determinó la dosis letal media (DL<sub>50</sub>) del extracto total mediante el método de Lorke y, 4) se evaluó su potencial de daño al ADN en sangre periférica mediante el conteo de eritrocitos policromáticos micronucleados (EPMN); y la citotoxicidad de acuerdo a la relación de eritrocitos policromáticos/eritrocitos normocrómicos (EP/EN). Los resultados obtenidos respecto al segundo punto indicaron que el extracto fue moderadamente tóxico ya que la DL<sub>50</sub> resultó de 282.8 mg/kg administrado por vía oral. Para el tercer aspecto se utilizó solución salina (SS) administrada por vía oral para el grupo negativo, 4 mg/kg de Daunorubicina (Dau) administrada por vía intraperitoneal para el grupo positivo y las dosis de 1, 10, 30 y 100 mg/kg del extracto de las raíces de HL administradas por vía oral en ratones machos de la cepa CD1<sup>+</sup>. Las observaciones se hicieron a las 0, 24, 48, 72 y 96 h después del tratamiento; la administración de HL en las cuatro dosis empleadas no produjo modificación significativa en la prevalencia de EPMN ni EP ya que fueron similares con respecto al grupo control; sin embargo la administración de Dau incrementó a partir de las 48 h efecto que se mantuvo hasta las 96 h con un aumento significativo de la eritropoyesis de 54, 54 y 55% respectivamente más con respecto al control. Por lo tanto los resultados obtenidos no implican un riesgo de genotoxicidad ni citotoxicidad por parte de HL.

**Palabras clave:** genotoxicidad, citotoxicidad, *Heliopsis longipes*, afinina, alcamidas.

## ABSTRACT

*Heliopsis longipes* S.F. Blake (HP) (Asteraceae), better known as “chilcuague”, is a Mexican native plant mainly found in a portion of land between the Sierra de Alvarez and the Sierra Gorda, in the Mexican states of San Luis Potosí, Guanajuato and Querétaro. The HP has anesthetic, antiparasite and insecticide effects and is also used as a spice for cooking, because it enhances flavor and it adds a hot spicy flavor to regional food. This plant has been subject to few studies and so far there are no data regarding the toxicity of the extract of this plant. Considering this, the main objective of the present paper was to evaluate the toxicity of the roots of *Heliopsis longipes* using micronucleus techniques. The sequence of this research was as follows: ethanolic extract was gotten from the roots of *Heliopsis longipes* using Soxhlet extraction. The level of toxicity of the ethanolic extract from the roots was determined using mice. After this, the medium lethal dose was determined (DL<sub>50</sub>) by using Lorke’s method and the damage potential to DNA was evaluated in peripheryc blood by counting polychromatic micronucleus erythrocytes (EPMN) and the toxicity in cells according to the relation between polychromatic and normochromatic erythrocytes (EP/EN). The obtained results regarding the second point indicated that the extract was mildly toxic since the DL<sub>50</sub> was of 282.8 mg/kg, by oral administration. For the third aspect, salt solution was used for the negative group, 4 mg/kg of daunorubicin (Dau) for the positive group using doses of 1, 10, 30 and 100 mg/kg of the root extract of HL administered orally in CD1+ male mice. Observations were performed at 0, 24, 48, 72 and 96 hours after treatment. The administration of HL in the four used doses did not produced significant modification in EPMN prevalence in EP, since they were similar to the ones in the control group. However, the administration of Dau increased the effect at the 48 hours and this was sustained up to 96 hours later, showing a significant increase of erithropoiesis of 54, 54 and 55% respectively to the control. Because of this, the obtained results do not imply a risk of genotoxicity or citotoxicity by HL.

**Key words:** genotoxicity, citotoxicity, *Heliopsis longipes*, afinine, alcamides.

Existen en el mundo 12 países que son considerados con vasta diversidad de plantas, en las que se encuentra el 60 al 70% del total de la biodiversidad del planeta; Brasil, Colombia, Indonesia y México, ocupan las primeras posiciones en la lista. En éste último país 47 500 especies de plantas son reconocidas hasta ahora y varias de estas especies son utilizadas por la población en diferentes regiones de nuestro territorio; México se ocupa de la cosecha principalmente de maíz, chile, cacao, aguacate, tomate, cacahuete y frijol, alimentos asociados a la población con diferentes aplicaciones tradicionales incluyendo alimentaria, medicinal y ornamental (Cruz y col, 2006).

Sin embargo, existe una gran variedad de productos naturales utilizados por la población, los cuales han sido poco explorados a nivel científico, y resulta necesario realizar estudios toxicológicos; para evaluar si su consumo es seguro o de lo contrario evitarlo. Tal es el caso de *Heliopsis longipes*, una planta mexicana de la familia Astaraceae, nativa de los estados de San Luis Potosí, Guanajuato y Querétaro; utilizada tradicionalmente con aplicación culinaria y medicinal (Molina y García, 2001; Litle 1948).

### 1.1 Especies vegetales comestibles.

Las especies vegetales que se aprovechan y cosechan en cada región y localidad de nuestro país, tanto por grupos étnicos como por campesinos, sigue siendo una fuente constante de plantas comestibles.

Gispert (1997) expone un listado de plantas alimentarias de las cuales se saben sus bondades empíricas y sus comprobaciones científicas al día y las divide en seis tipos:

- 1) **Flores:** La presencia de flores como alimento nos acerca a una cultura alimentaria que propicia lo nutritivo y lo estético por ejemplo:

- Flor de calabaza (*Curcubita pepo L.*); conocida por su fruto y cosechada en Asia y África desde el siglo XVI.
- Flor de isote o yuca (*Yucca elephantipes Regel*); la cual contiene ácido ascórbico, calcio y proteína principalmente.
- Flor de tzompantli (*Erithryna americana Mill*); que fritos o hervidos se utilizan como excelente complemento alimentario.

## 2) Condimentos:

- Epazote (*Chenopodium ambrosioides L.*); se utilizan desde tiempo inmemorable para dar sabor a los frijoles o guisos de pescado; sus principales componentes son proteínas, calcio, hierro, caroteno y riboflavina.
- Achiote (*Bixa Orellana L.*); condimento y al mismo tiempo colorante, posee alto contenido de vitamina A.

## 3) Raíces

- Jícama (*Pachyrrizus erosus L.*); sus principales componentes son carbohidratos, proteína y agua.
- Yuca, huacamote o casave (*Manihot esculenta Gantz*); posee carbohidratos, hierro, proteínas, grasa y agua.

## 4) Verduras:

- Tomate verde (*Physalis ixocarpa Brot.*) y tomate rojo (*Lycopersicon esculentum Mill.*); contiene proteínas, niacina y hierro principalmente.
- Aguacate (*Persea americana Mill.*); se prepara en guacamole, helado y ensaladas.
- Chaya (*Cnidosculus chayamansa Mc. Vaugh*); contiene proteínas, calcio, hierro, ácido ascórbico y retinol.
- Chayote (*Sechium edule Sw*); según la variedad puede ser verde oscuro, claro o amarillo y según la superficie puede ser lisa o tener espinas, sus raíces se conocen como “chayolestle” y también son comestibles, por su sabor neutro puede ser preparado de infinidad de maneras.

## 5) Semillas y granos

- Chía (*Salvia hispánica* L.); existen dos tipos la blanca y la negra, ambas utilizadas en la preparación de bebidas refrescantes.
- Huautli, amaranto, bledo (*Amaranthus hypocondriacus* L.); posee gran cantidad de lisina, leucina y triptófano.
- Maíz (*Zea mays* L.); Tiene uno de los primeros lugares de producción mundial de cereales, se le considera una planta sagrada desde la antigüedad, y hasta el momento es fuente de prodigiosidad culinaria.

## 6) Frutas

- Guayaba (*Psidium guajava* L.); posee gran cantidad de ácido ascórbico.
- Ciruelas o jocos (*Spondias*); con dos especies amarilla (*S. mombin* L.) y colorada (*S. purpurea* L.); se come al natural, en conserva, ates, dulce, salsa, atoles y agua fresca.
- Papaya (*Carica papaya* L.); posee alto contenido de lisina.
- Capulín (*Prunus capulí* Cav.); se comen crudos, en conserva o tamales; también se obtiene una bebida alcohólica llamada licor de capulín que es muy digestiva.
- Tejocote (*Crataegus mexicana* Moc.); se come al natural, o se elaboran jaleas y mermeladas por su alto contenido de pectinas.
- Tunas o higos chumbos (*Opuntia*), los géneros que producen frutos es *Opuntia ficus-indica* L. Mill; *O. lindheimeri* Engelm, y *O. streptacantha* Lemaire; los nopales se reproducen por medio de las pencas o cladodios, los frutos, las pencas e incluso las flores son comestibles, pudiéndose preparar de una infinidad de maneras, obteniéndose hasta una miel por la cocción de las tunas.

En otro análisis de plantas realizado por Cruz y col, (2006) mostró plantas con propiedades alimentarias, medicinales e importantes para la agricultura, entre las cuales destacaron las siguientes:

- Nopal (*Opuntia* spp.), maíz (*Zea mays*), amaranto (*Amaranthus hypochondriacus*), agave (*Agave* spp.), Marigold (*Tagetes erecta*), chilcuague (*Heliopsis longipes*), mezquite (*Prosopis juliflora*), huitlacoche o cuitlacoche (*Ustilago maydis*).

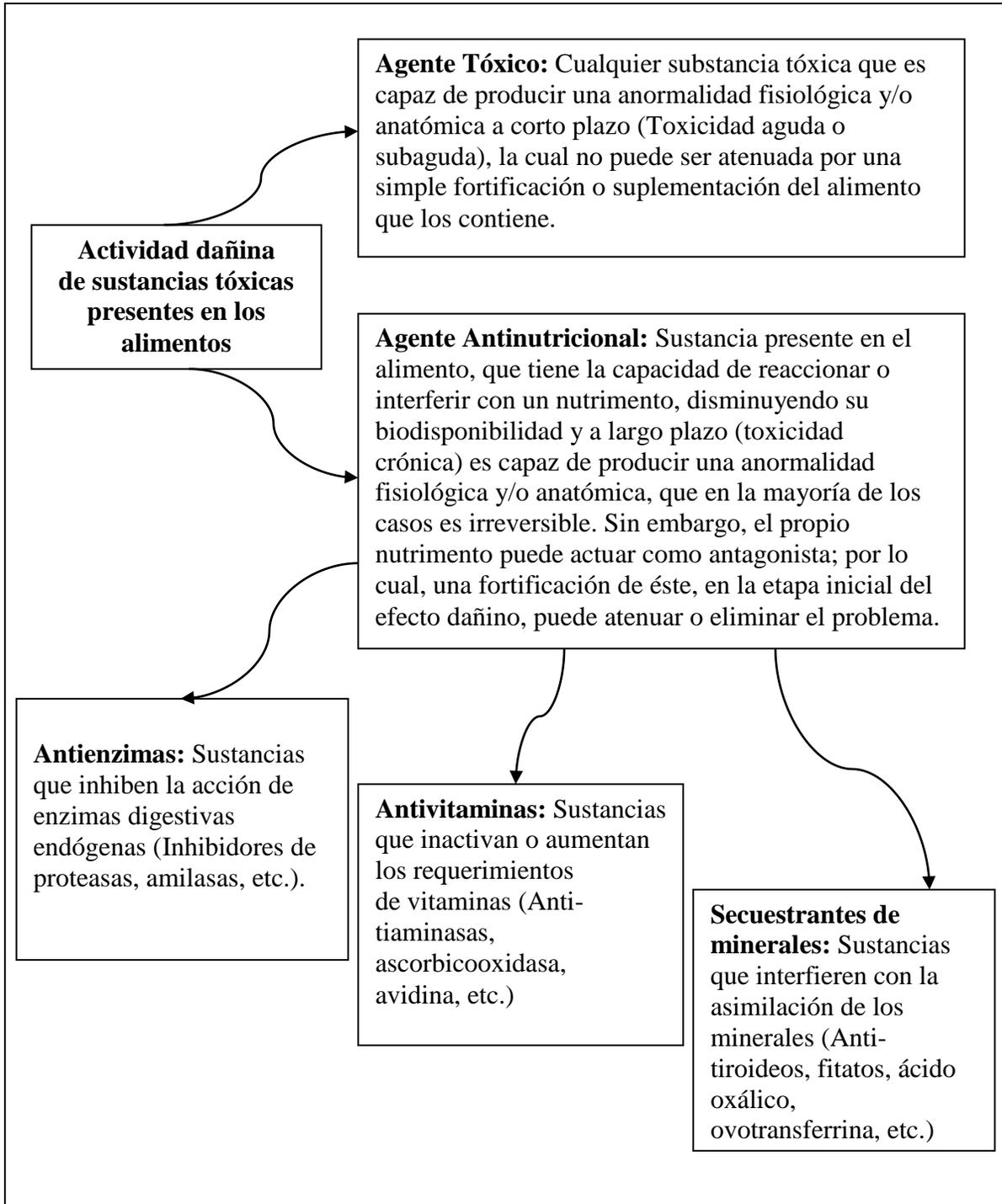
En este análisis dichas especies muestran un alto potencial agroalimentario, debido a su contenido en vitaminas, minerales otros metabolitos como alcaloides y terpenos; además de su gran uso por tradicional por parte de la población.

## **1.2 Intoxicación alimentaria.**

Las enfermedades transmitidas por los alimentos (ETA), constituyen el problema de salud pública más extendido en el mundo, por lo que es necesario mantener una vigilancia epidemiológica y aplicar medidas oportunas que permitan su control y prevención (Ramos, 2004).

Entre las causas de enfermedades transmitidas por los alimentos se encuentran las intoxicaciones. La intoxicación alimentaria se define como aquella intoxicación provocada por cualquier alimento o producto alimenticio que contiene sustancias tóxicas como gérmenes, metales, aditivos, hormonas, etc. (Pinillos y col, 2003) que provocan daño cuando son ingeridas a través de los alimentos, las cuales interfieren con la biodisponibilidad de algún nutrimento. Se pueden distinguir dos tipos de sustancias dañinas que pueden ser ingeridas a través de los alimentos, las cuales son: agentes tóxicos y agentes antinutricionales (ver cuadro 1) (Valle y Florentino, 2000).

**Cuadro 1. Sustancias dañinas que pueden ser ingeridas a través de los alimentos.**



Tomado de: Valle y Florentino, 2000.

### **1.3 Componentes tóxicos de los alimentos.**

Respecto al origen o presencia de los tóxicos en alimentos, se pueden considerar cuatro fuentes principales: naturales, intencionales (como serían los aditivos), accidentales (como serían los contaminantes) y generados por proceso (Cuadro 2), sin que esta clasificación asigne estrictamente un tóxico a una categoría, ya que estos, pueden pertenecer a más de una o bien asociarse al área farmacológica. La clasificación de tóxicos se complica, ya que variaciones menores en su estructura los pueden hacer peligrosos o no. Si por otro lado, a un tóxico se le asocia a un grupo de alimento, tampoco puede ser absoluta esta consideración para su clasificación, ya que por ejemplo los glucósidos cianogénicos pueden encontrarse en leguminosas, tubérculos, cereales, etc. Por otro lado, el origen de los compuestos puede contribuir al caos de su clasificación, como sucede en el caso de las aflatoxinas, que son de un origen natural, pero contaminantes en varios alimentos (Valle y Florentino, 2000).

**Cuadro 2. Presencia de agentes tóxicos en alimentos.**

<b>NATURALES</b>							
<b>Leguminosas</b>	<b>Cereales</b>	<b>Bebidas estimulantes</b>	<b>Proteínas, péptidos, aminoácidos</b>	<b>Antivitaminas</b>	<b>Varios</b>		
Glucósidos Cianogenados Promotores de flatulencia Inhibidores enzimáticos Aglutininas Saponinas Favismo	Micotoxinas: <i>Aspergillus</i> <i>Penicillium</i> <i>Fusarium</i> <i>Claviceps</i> Ácido fítico Inhibidores de amilasas	Cafeína Teofilina Teobromina Alcohol	Toxina botulínica Toxina estafilococo Toxina CI. perfringes Falotoxina Anatoxina Islanditoxina Latirismo Selenoaminoácidos Mimosina Hipoglicina Canavanina	Avidina Antivitamina K (Dicumarol) Lipoxidasa Antivitamina D (cital) Tocoferol oxidasa Antiniacina Antipiridoxina (1amino D prolina)	Gosipol (algodón) Solanina, chaconina (papa) Ipomeamarona (camote) Bocio (Crucíferas, mostaza) Tetradotoxina, saxitoxina ( pescados y mariscos) Aminas biógenas (quesos) Taninos (sorgo) Colesterol (huevo) Sasfrol (sasafrás) Caries (sacarosa) Mutágenos ( champiñones) Cicacina (cicadas)		
<b>INTENCIONALES (ADITIVOS)</b>							
Conservadores Colorantes Potenciadores Antioxidantes	Saborizantes Aromatizantes Edulcorantes Saborizantes	Nitratos Nitritos Emulsificantes Clarificantes	Minerales Acidulantes Secuestrantes Gomas	Disolventes Antiespumantes Enzimas Vitaminas	Enturbiantes Diluyentes Humectantes etc.		
<b>ACCIDENTALES</b>							
<b>PLAGUICIDAS</b>		<b>METALES</b>		<b>MICROORGANISMOS</b>		<b>VARIOS</b>	
Organoclorados Carbamatos Nicotinoides Piretrinas	Ciclodienos Rotenoides, etc.	Plomo Mercurio Selenio Aluminio	Cadmio Arsénico CRM, etc.	Salmonella Coliformes Clostridium Virus	Shigela Coliformes Estafilococos, etc.	Radiaciones Triquinosis Antibióticos Ftalatos	Hormonas PVC Medicamentos
<b>TÓXICOS GENERADOS DURANTE EL PROCESAMIENTO DE ALIMENTOS</b>							
Reacciones de Maillard, Hidrocarburos policíclicos aromáticos		Racemización de a.a. Aminas biógenas	Nitrosaminas Isopéptidos	Quinolininas Clorhidrininas	Bromhidrininas Degradación de aminoácidos		

Tomado de: Valle y Florentino, 2000.

## 1.4 Genotoxicidad.

Un genotóxico, es un compuesto que produce alteraciones en los ácidos nucleicos, modificando las características heredables o inactivando el ADN (Brusick, 1987).

El propósito principal de la Genética Toxicológica es la evaluación toxicológica de los compuestos químicos para:

- 1) Identificar mutágenos peligrosos.
- 2) Determinar los mecanismos mutagénico y la relación dosis-respuesta.

Todo ello para entender los riesgos genéticos y carcinogénicos que afectan la salud de los individuos (Martino, 2003).

Para identificar la acción mutagénica en ensayos *in vivo* e *in vitro*, se han utilizado más de 150 sistemas de prueba; los métodos empleados con mayor frecuencia se muestran en el cuadro 3. De ahí se derivan los ensayos genotóxicos, los cuales pueden identificar mutaciones en células germinales y somáticas, así como determinar el potencial carcinogénico de los xenobioticos (Brusick, 1987).

Se ha sugerido que en un estudio agudo, el monitoreo de la frecuencia de eritrocitos policromáticos micronucleados (EPMN) es el más adecuado, en virtud de que estas son células jóvenes producidas y liberadas durante el tiempo del experimento, esto se deduce en los experimentos realizados por McGregor, quien propone que los organismos deben estar con el compuesto a estudiar el tiempo suficiente para alcanzar una condición estable, en la que las células micronucleadas alcancen su máxima frecuencia en el tejido en estudio, dicha frecuencia permanece constante cuando la producción de las células dañadas se equilibra con la pérdida de la misma población celular (McGregor, 1990).

**Cuadro 3. Sistemas de prueba para identificar agentes mutagénicos.**

<b>Pruebas</b>	
<b>Ames</b>	Detecta generaciones génicas
<b>Micronúcleos</b>	Fragmentos cromosómicos o cromosomas que no se incorporan a las células hijas.
<b>Locus específico</b>	Método para detectar y medir las proporciones de mutación en un <i>locus</i> recesivo.
<b>Electroforesis unicelular en gel (Ensayo Cometa)</b>	Detecta rompimientos en el ADN de cadena sencilla, sitios álcali lábiles, y sitios retardados de reparación.
<b>Reparación del ADN</b>	Rastrea la reparación del ADN.
<b>Síntesis programada de ADN</b>	Detecta la síntesis de ADN durante la fase no sintéticas.
<b>Conversión génica</b>	Se recobran marcadores desiguales que resaltan del intercambio durante la recombinación.
<b>Recombinación mitótica</b>	Perdida de la heterocigosis y recombinación intragénica.
<b>Aberraciones cromosómicas</b>	Lesiones causadas por agentes S-dependientes o S-independientes (rupturas, intercambios, puentes).
<b>Intercambio de cromátides hermanas</b>	Detecta el intercambio de ADN en cromosomas metafásicos entre los productos de réplica en <i>loci</i> homólogos.
<b>Aneuploidías</b>	Mide la falta de separación de cromosomas durante a mitosis o la meiosis.
<b>Mutaciones en células somáticas</b>	Utiliza la inducción y aislamiento de genes en células de mamíferos en cultivo, identificando los cambios genéticos.
<b>Dominantes letales</b>	Mide los cambios genéticos inducidos de manera dominante, que matan al cigoto (midiendo y contando el número de implantes que sobreviven).
<b>Prueba vía el hospedero</b>	Usa dos especies diferentes, para detectar cambios heredables causados por la conversión metabólica de los agentes químicos.
<b>Anomalías en espermatozoides</b>	Cambios morfológicos del esperma.
<b>Transformación oncogénica</b>	Utiliza criterios morfológicos para detectar diferencias citológicas entre células normales y tumorales.

Tomado de: Martino, 2003.

## 1.5 Prueba de micronúcleos.

Los micronúcleos (MN) se definen como uno o más fragmentos cromosómicos acéntricos o cromosomas completos que sufren un rezago anafásico, lo cual se traduce en la aparición de un núcleo pequeño en el citoplasma de las células nucleadas y anucleadas; con colorantes vitales se tiñen de color púrpura, se encuentran en el citoplasma de los eritrocitos, o bien de las células nucleadas como los linfocitos o las espermatogonias y no son refráctiles, por lo cual pueden ser distinguidos de artefactos (restos de colorante, fragmentos de otras células, entre otros) (Cariño, 2007).

La evidencia de fragmentos intracitoplasmáticos de cromatina en eritrocitos circulantes permite evaluar el daño ocasionado por agentes causantes de rezago anafásico durante la mitosis o de compuestos que dañan el material genético provocando rupturas; por lo tanto el método de MN se considera útil y recomendado internacionalmente por European Economic Community (EEC) y la Organization for Economic Cooperation and Development (OECD) como parte de los requerimientos mínimos para la evaluación de la seguridad toxicológica de nuevos productos farmacéuticos, mediante la determinación del daño cromosómico en células anucleadas como los eritrocitos, o bien en el citoplasma de células nucleadas como los linfocitos o las espermatogonias. La eritropoyesis es un proceso que se efectúa en la médula ósea e incluye numerosas divisiones celulares que se inician a partir de una célula hematopoyética madre y culmina con la diferenciación del eritrocito. En las últimas etapas del proceso se pueden observar dos tipos celulares, los eritrocitos policromáticos (EPC), que son células inmaduras que contienen ARN y sintetizan ciertas proteínas, éstas obtienen el hierro que necesitan para la síntesis de hemoglobina, mediante la unión de la proteína plasmática transportadora de hierro o transferrina a receptores específicos de la superficie de la célula (CD71<sup>+</sup>). Al completar su síntesis de hemoglobina, los EPC disminuyen de tamaño, pierden su receptor de transferrina y terminan su maduración convirtiéndose en eritrocitos normocrómicos (ENC). Durante las etapas previas a la formación de estos dos tipos de eritrocitos, las células sanguíneas pueden ser atacadas por xenobioticos y sufrir lesiones cromosómicas que se manifiestan como MN, los cuales permanecen en el eritrocito, aun

cuando el núcleo principal se haya expulsado. El hecho de que en un estudio agudo el monitoreo de la presencia de MN se realice en eritrocitos policromáticos (EPC), se debe a que estas células jóvenes (reticulocitos) son producidas y liberadas durante el tiempo de estudio (de 1 a 4 días). Es por ello que constituyen una forma eficaz de evaluar la capacidad clastogénica de los compuestos en un tiempo corto. Los EPC presentan una coloración que incluye a la basofilia y la eosinofilia. Como todavía contienen ácido ribonucleico se observan con un tinte azulado violáceo, su tamaño es un poco mayor al de los eritrocitos normocrómicos y son células que proceden de los normoblastos que pierden su núcleo antes de que la hemoglobinización sea completa, generalmente un aumento en su número indica una eritropoyesis aumentada. De tal forma que además de identificar el potencial genotóxico del xenobiotico, es posible sugerir su citotoxicidad cuantificando la relación que existe entre los EPC y los ENC. La identificación de MN, consiste comúnmente en la observación microscópica de las células teñidas con el colorante Giemsa o bien, con naranja de acridina; sin embargo, actualmente la cuantificación puede realizarse utilizando un analizador de imágenes o con citometría de flujo (Cariño, 2007).

### **1.6 Estudios genotoxicos de productos vegetales.**

Estudios relacionados a la toxicidad de productos vegetales de uso comestible y/o medicinal han mostrado que algunos extractos etanólicos de éstos poseen actividad toxicológica como es el caso de *Baccharis dracunculifolia* (D.C.) (Asteraceae), una planta nativa de Brasil utilizada para desordenes digestivos, demostró por medio del ensayo cometa y la prueba de micronúcleos que ocasiona daño genotóxico (Rodríguez y col, 2009); otro es el caso de *Abuta grandifolia* una planta utilizada en Colombia por los indígenas para la fiebre demostró tener una alta toxicidad mediante pruebas *in vitro* (Afife Mrad y col, 2004); además la evaluación de 2 plantas utilizadas en el estado de Hidalgo denominadas *Juniperus deppeana* y *Bidens odorata* de uso tradicional para el tratamiento de úlceras, heridas y tumores, por medio de ensayos *in vitro* demostró que *J. deppeana* posee la más alta toxicidad, seguida de *B. odorata*, (Villavicencio y col, 2008) por lo tanto no es segura la utilización de este tipo de plantas para la salud humana. Sin embargo, otros estudios muestran que plantas como

*Melampodium divaricatum*, una planta de la familia Asteraceae, nativa de Brasil, por medio de la prueba de Ames no mostró genotoxicidad; por el contrario otros estudios sugieren que esta planta posee propiedades quimiopreventivas (Ikuma y col, 2006); por otro lados la evaluación toxicológica del extracto de *Artemisa dracuculus* L. (TARRALIN), originaria de Rusia, de uso medicinal y culinario, tampoco presento toxicidad mediante la prueba de Ames aun en altas concentraciones (Ribnicky y col, 2004); así mismo se evaluó la toxicidad *in vitro* de la cáscara de la uva (*Vitis labrusca*) mediante la prueba de Ames, la de cromotest con *E. coli* y el ensayo cometa, en las cuales no presentó actividad mutagénica ni citotóxica (Aiub y col, 2004); otro estudio demostró que algunos extractos de plantas chinas como la *Scutellaria baicalrnsis* Georgi, la *Drynaria fortunei* (Kze.) J. Sm. y *Sophora japonica* L., entre otras, tienen una importante actividad farmacológica y presentan poca toxicidad celular (Ng y col, 2000). Recientemente un estudio realizado a 53 plantas de la familia Annonaceae, logró comprobar que en las especies analizadas los metabolitos con mayor actividad capturante de radicales libres son de carácter polar y que por su parte los agentes responsables de la citotoxicidad son generalmente, no polares (Jiménez y col, 2005).

Debido a los antecedentes existe un amplia gama de productos vegetales de uso terapéutico y alimentario por parte de poblaciones en diferentes países, por lo tanto es necesario un amplio estudio a nivel científico, de la diversidad de plantas con propiedades curativas y alimentarias a nivel celular, para garantizar su uso adecuado para las diferentes poblaciones en el mundo donde tienen mayor demanda.

### **1.7 Mutación y carcinogénesis.**

Una mutación se define como los cambios al azar en la cantidad, cualidad y arreglo de los genes en las replicaciones celulares subsecuentes, y que tiene la posibilidad de manifestarse como una alteración cromosómica y/o como un cambio fenotípico en los organismos afectados y se clasifican en mutaciones espontáneas e inducidas. Ver cuadro 4 (Klaassen, 2001).

#### **Cuadro 4.**

##### **Tipos de mutaciones que se producen en el ADN debido a la naturaleza del agente.**

<b>Espontáneas</b>	<b>Inducidas</b>
Ocurren de manera natural y se producen en condiciones normales de crecimiento y de ambiente.	Son aquellas provocadas por la exposición directa o indirecta a agentes externos de diversa naturaleza.

Tomado de: Klaassen, 2001

Los agentes capaces de producir una mutación reciben en nombre de mutágenos y estos se clasifican de acuerdo a su naturaleza en físicos, químicos y biológicos (Muñoz, 2001). Ver cuadro 5.

Cuando las mutaciones se producen sobre el ADN de las células somáticas, esta alteración se traduce en el desarrollo de enfermedades crónicas degenerativas, o bien iniciando un proceso canceroso (carcinogénesis) (Martino, 2003).

**Cuadro 5. Tipos de mutágenos.**

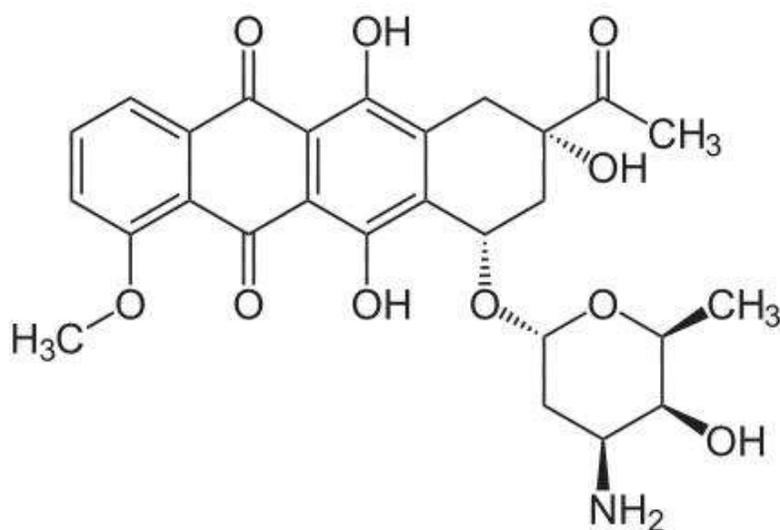
<b>Físicos</b>	Radiaciones electromagnéticas	Radiaciones gamma, rayos X, luz ultravioleta, luz invisible (en conjunción con un agente fotodinámico)
	Energía calorífica	
<b>Químicos</b>	Agentes alquilantes	Etil metano, sulfonato, metil etano sulfonato, N-metil-N'-nitro-N-nitroso guanidina.
	Agentes desaminantes	Ácido nitroso, bisulfito
	Análogos de bases	5-Bromo uracilo, 2-amino purina.
	Agentes intercalantes	Anaranjado de acridina, proflavina, ICR 191 (mostaza nitrogenada).
	Agentes misceláneos	Hidroxilamina, hidracina, formaldehido, aflatoxina B1, benzoapireno, 4 nitroquinolina, estragol.
<b>Biológicos</b>	ADN polimerasas alteradas	
	Virus	
	Transposones (elementos que causan transposiciones del ADN)	

Tomado de: Muñoz, 2001.

## 1.8 Daunorubicina.

La Daunorubicina (Dau) es un antibiótico antineoplásico que posee actividad en el tratamiento de leucemias agudas linfocíticas y granulocíticas. Es producida por el hongo *Streptomyces puacetius* var. *Caesius* y fue aislada de forma independiente por Di Marco y Dubost y col. en 1983 (Cariño, 2002).

Por su estructura química se le clasifica dentro de la familia de las antraciclinas, ya que posee un grupo tetraciclino (núcleo antraquinona) con un azúcar poco común, la daunosamina, unida por enlace *N*-glucosídico (Ver figura 1).



**Figura 1. Estructura química de la Daunorubicina.**

Tomado de:

<http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/e/e4/Daunorubicin.svg/446px-Daunorubicin.svg.png>

Por dicha estructura la Dau ejerce su actividad antitumoral, actúa como un antineoplásico principalmente en el tratamiento de cáncer de seno y vejiga, linfomas de Hodgking's; sin embargo, en estudios experimentales se ha demostrado también su actividad cardiotoxica (Weinstein y col, 2000; Neila y col, 2007).

### 1.8.1 Mecanismos de acción.

Se han descrito varias acciones bioquímicas de la Dau (ver figura 2) que pueden tener relación con sus efectos terapéuticos y citotóxicos; como la intercalación en las bases de ADN, la unión covalente a metabolitos reactivos, interacción con membranas, ruptura de cadenas de ADN mediada por la topoisomerasa II, que produce especies reactivas de oxígeno (ERO), producción de radicales libres, formación del complejo férrico y alquilación (Cariño, 2002; Mizutani, 2005).

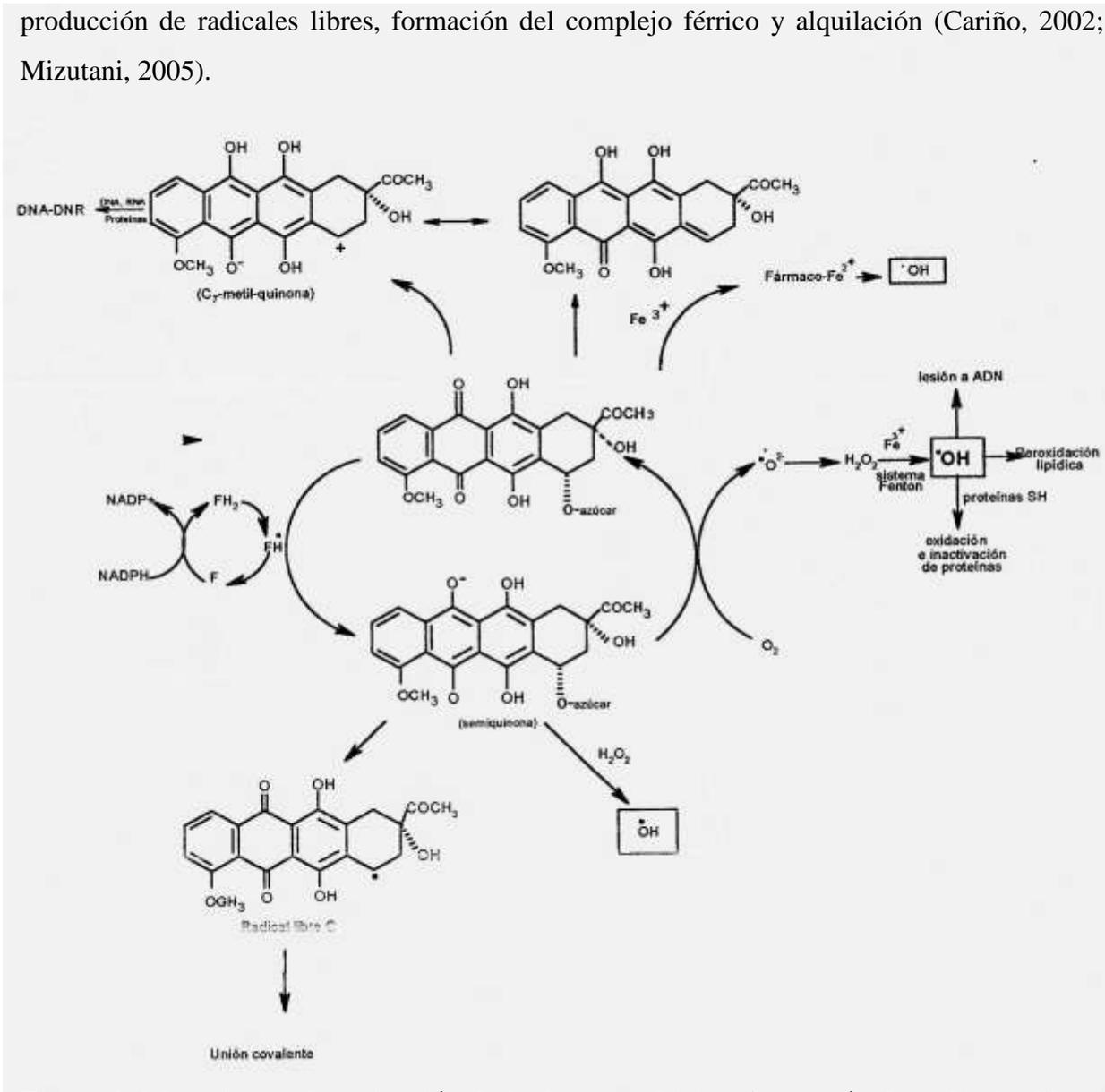


Figura 2. Mecanismos de activación de la daunorrubicina, formación de radicales libres y sus implicaciones biológicas (Cariño, 2002).

Ha sido reportado que la Dau induce daño por mecanismos de aumento en el intercambio de cromátidas hermanas y por la formación de MN. Por esta razón, es usada como control positivo en estudios experimentales (Paniagua y col, 2009).

### **1.9 *Heliopsis*.**

El género *Heliopsis* pertenece a la tribu Heliantheae de la familia Atereceae. Incluye 14 especies, la mayoría endémicas en México y aun no todas totalmente definidas (ver cuadro 6). Los hábitats de estas especies son variados, desde regiones áridas hasta las francamente húmedas y desde las cálidas hasta las del clima templado. La mayor parte de los representantes de *Heliopsis* son plantas perennes con la excepción de cinco especies anuales (*H. annua*, *H. anomala*, *H. filifolia*, *H. parviceps* y *H. sinaloensis*) endémicas de México. (García, 2004).

**Cuadro 6. Distribución de especies conocidas de *Heliopsis*.**

<b>Especie</b>	<b>Distribución Geográfica</b>
<i>H. filifolia</i> S. Wats.	Cuatro Ciénegas, Carneros y Puerto Colorado, Coahuila
<b><i>H. longipes</i> (Gray) Blake</b>	<b>Sierra Gorda, en el centro del país en la región de colindancia de los estados de Guanajuato, San Luis Potosí y Querétaro</b>
<i>H. sinaloensis</i> B. L. Turner	Imala, Sinaloa
<i>H. novogaliciana</i> B. L. Turner	Sierra Madre Occidental. Jalisco, Nayarit, Sinaloa, Chihuahua y Durango
<i>H. parviceps</i> Blake	Vertiente pacífica de México. Sinaloa, Michoacán, Guerrero, Estado de México
<i>H. procumbens</i> Hemsl.	Eje Volcánico Transversal. Jalisco, Michoacán, Estado de México, Distrito Federal, Hidalgo, Morelos, Tlaxcala, Puebla y Veracruz
<i>H. buphthalmoides</i> (Jacq.) Dunal	La especie de más amplia distribución geográfica del género. Sierra Madre Occidental, Sierra Madre del Sur, Cordillera Centroamericana y los Andes. Durango, Sinaloa, Nayarit, Jalisco, Michoacán, Estado de México, Morelos, Guerrero, Puebla, Oaxaca y Chiapas en México; toda Centroamérica, Colombia, Venezuela, Perú y Bolivia en Sudamérica
<i>H. parviflora</i> Gray	Zonas áridas y semiáridas del norte de México y sur de Estados Unidos. Zacatecas, Aguascalientes, Durango, Nuevo León, Coahuila, Chihuahua y Sonora en México; California, Arizona, Nuevo México y Texas en los Estados Unidos
Extraterritoriales a México	Distribuidas solamente fuera de México
<i>H. gracilis</i> (Gray) Nutt.	Del suroeste de Georgia, norte y centro de Florida al sur de Alabama
<i>H. helianthoides</i> (L.) Sweet	Oriente de Estados Unidos

Tomado de: García, 2004.

### 1.10 *Heliopsis longipes* (HL)



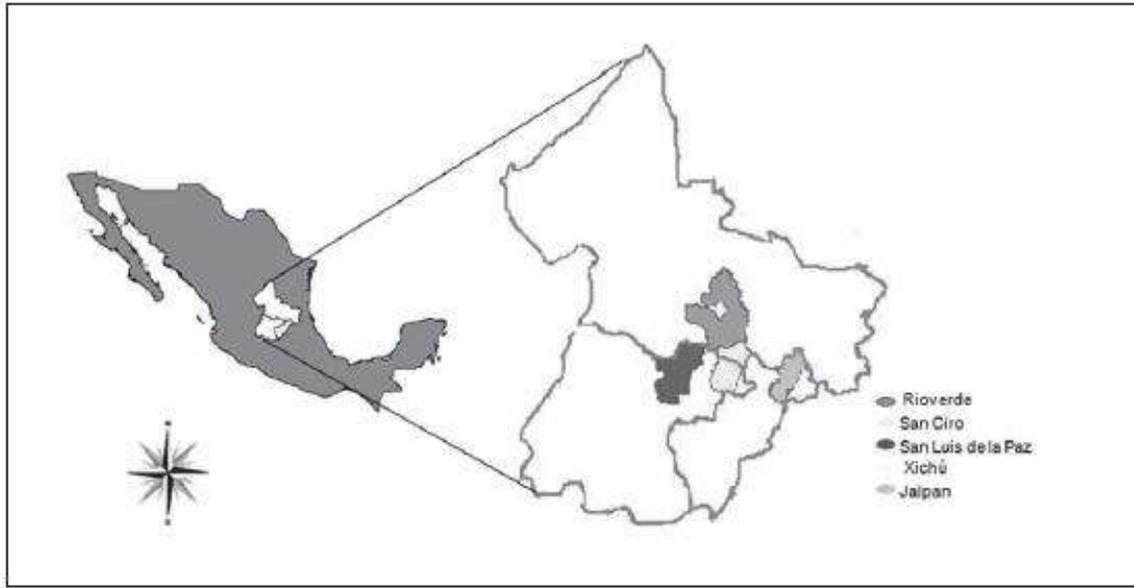
**Figura 3.** Arbusto de *Heliopsis longipes* y forma de comercialización de las raíces de *Heliopsis longipes*. Tomado de Molina y García, 2001.

#### 1.10.1 Generalidades.

*Heliopsis longipes* S.F. Blake (Asteraceae) (HL), conocido como “chilcuague” (ver figura 3), otros nombres registrados son: “ichcha”, citado en la traducción de la obra de Francisco Hernández “De historia plantarum Novae Hispaniae”; “chilcuán”, significando chile de víbora; “chilmécatl”, “dechili”, “chile y mécatl”, mecate, aludiendo a las raíces filiformes y al sabor picante de éstas; “chilicuau”, nombre que se usa en el municipio de San Joaquín, en Querétaro. Asimismo, Martínez (1994) registra pelitre o peritre como epítetos que probablemente se le asignaron durante la era de la colonia (García y col, 2004).

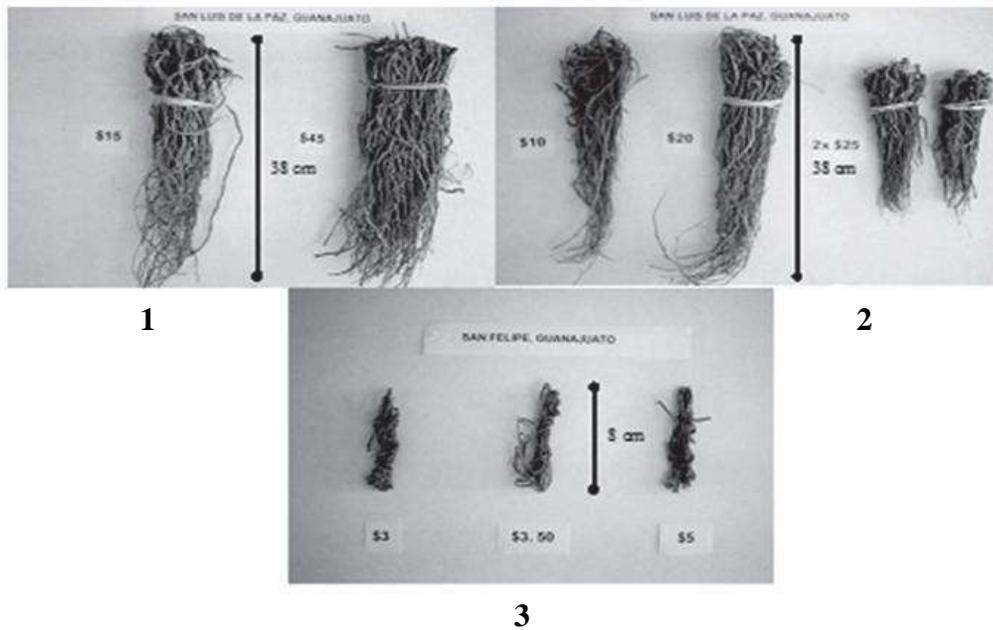
#### 1.10.2 Localización.

HL se localiza principalmente en la región conformada por porciones de la Sierra de Álvarez y la Sierra Gorda, donde coinciden parte de los estados de San Luis Potosí, Guanajuato y Querétaro en México (ver figura 4) (Molina y col, 1999; Cilia y col, 2008).

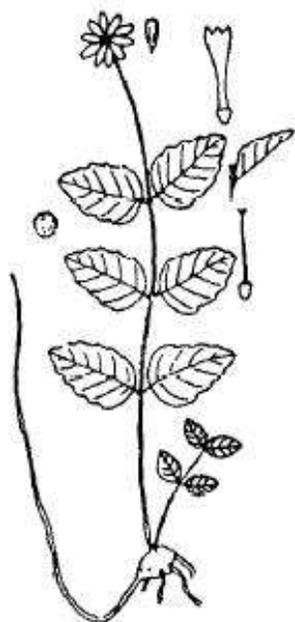


**Figura 4. Localización geográfica de *Heliopsis longipes*.** Tomado de Cilia y col, 2008.

En la actualidad se puede encontrar esta especie comercializada en los puestos de hierbas medicinales de casi todo el país con nombres más modernos como raíz de oro y raíz azteca (García, 2004; Cruz y col, 2006).



**Figura 5. Presentaciones de venta del chilcuague. 1y 2 manojos elaborados por el recolector y 3 manojos elaborados por los comerciantes.** Tomado de Cilia y col, 2008.



*Chilcuague*  
(*Heliopsis longipes*)

**Figura 6. Chilcuague**

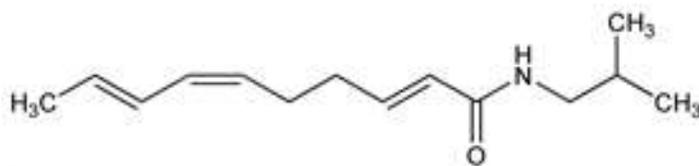
Tomado de: Martínez, 1959. (Molina y García, 2001; Litle, 1948).

### 1.10.3 Usos tradicionales.

HL (ver figura 6), es un recurso de uso medicinal y culinario, en la medicina popular se utiliza como analgésico y anestésico local y como antibiótico para infecciones de los aparatos respiratorio y digestivo; otras actividades biológicas que se le han atribuidos son: actividad antiviral, en el tratamiento de las úlceras bucales y de algunas variedades de herpes; actividad fungicida, en el tratamiento del pie de atleta; actividad mulsocida y en el tratamiento de algunos parásitos intestinales. En la cocina se utiliza en la preparación de salsa picante acompañado de chile, donde lo complementa y resalta el sabor; también se utiliza como condimento en frijoles y nopales, en las cantinas agregan “varitas” de las raíces de HL al aguardiente, para hacer más suave su paso por la garganta

### 1.10.4 Antecedentes experimentales de HL.

HL fue la primera especie en la que se determinó la presencia de una alcalamida olefínica; sin embargo, la planta cuya muestra de raíces fue sometida para su análisis en laboratorio resultó erróneamente identificada como *Erigeron affins* y así, la amida aislada fue denominada afinina. La afinina (ver figura 7), está presente en cinco especies de alcalamidias olefínicas: *Wedelia parviceps* Blake, *Acmella ciliata* H.B.K., *A. oleracea* L., *A. oppositifolia* (Lam.) Jansen, y *H. longipes* S.F. Blake. Esta alcalamida está presente en mayor cantidad en las raíces de HL que en las demás especies que contienen alcalamidias, lo que justifica su uso tradicional (Molina y col, 1996, 1999, 2001; García y col, 2004).



**Figura 7. Estructura química de la afinina.**

Tomado de: <http://www.medicinescomplete.com/mc/merck/current/images/12395235.gif>

Estudios previos han demostrado que la afinina posee propiedades antimicrobianas y fungistáticas en modelos *in vitro* (Molina y col, 1999, 2001), así como efectos antinociceptivos (Ogura y col, 1982), analgésicos y antiinflamatorios en patologías dentales y orales en humanos (Colvard y col, 2006). Además, ha sido reportado que la solución diclorometano del extracto de HL mostró actividad analgésica determinada por la inducción del ácido gamma-aminobutírico (GABA) en cortes de cerebro de ratón (Ríos y col, 2007) y la interacción sinérgica algésica entre el extracto etanólico de las raíces de HL y diclofenaco en una prueba de hiperalgesia térmica, lo cual sugiere que la combinación de bajas dosis de HL – diclofenaco pueden actuar a nivel sistémico (Acosta y col, 2009).

### 1.11 Alcamidas.

Comprenden un grupo de aproximadamente 70 estructuras conocidas y distribuidas a lo largo del reino vegetal. Están constituidas por la unión de un ácido graso, de longitud de cadena de mediana a larga que puede ser de 18 carbonos generalmente alifática o lineal, éste al condensarse con un aminoácido y descarboxilación concomitante, resulta en la producción de una alcamida. Dependiendo del número de enlaces o ligaduras dobles que presenten, las alcamidas se han dividido en dos subgrupos:

- Alcamidas olefínicas (dobles enlaces)
- Alcamidas acetilénicas (al menos una triple ligadura y con anillos homo o heterocíclicos)

Las alcaloides son consideradas como compuestos bioactivos, esto es, una pequeña cantidad de estos compuestos presenta una respuesta notable en las células receptoras (Molina y García, 2001; García, 2004); se manifiestan en unos cuantos grupos de plantas, de los cuales las más importantes están presentes en las familias:

- Astereceae
- Solanaceae (familia de las papas)
- Capsicum (chiles)
- Piperaceae (familia de la pimienta)

Cada una de ellas tiene características individuales pero sus moléculas bioactivas presentan estructuras químicas relacionadas (Molina y García, 2001).

## 2. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

De acuerdo a estudios realizados a los metabolitos aislados de las raíces de *Heliopsis longipes* se ha encontrado principalmente una alcanida denominada afinina como componente activo y responsable de sus principales efectos biológicos entre los que se pueden considerar la actividad anestésica local, saborizante, insecticida y bactericida

Hasta el momento no existen reportes en la literatura que indiquen su seguridad toxicológica y el riesgo del consumo culinario de las raíces de *Heliopsis longipes* a nivel celular y sobre el material genético. Por lo tanto, el presente estudio constituye la primera contribución orientada a la evaluación genotóxica de esta especie nativa, resultados que ayudaran a definir su uso en humanos o bien, evitar su consumo en caso de presentar riesgos para la salud.

## 3. JUSTIFICACIÓN

El hallazgo de alcanidas principalmente afinina en las raíces de *Heliopsis longipes* orienta a la necesidad de elucidar sus efectos sobre organismos íntegros y sobre su efecto que pudiera tener como condimento en los alimentos típicos de la región donde es endémica, debido a que no existen evidencias de estudios similares, se diseñó el presente documento para evaluar su capacidad genotóxica sobre células eucariotas y a nivel del ADN por medio de un estudio agudo, lo cual contribuirá a realizar más estudios experimentales con diferentes técnicas genotóxicas para evidenciar si el extracto de HL posee o no riesgos para la salud humana.

### Objetivo general

Evaluar la capacidad genotóxica del extracto de las raíces de *Heliopsis longipes* S.F. Blake en células hemáticas de ratones administrados por vía oral.

### Objetivos específicos

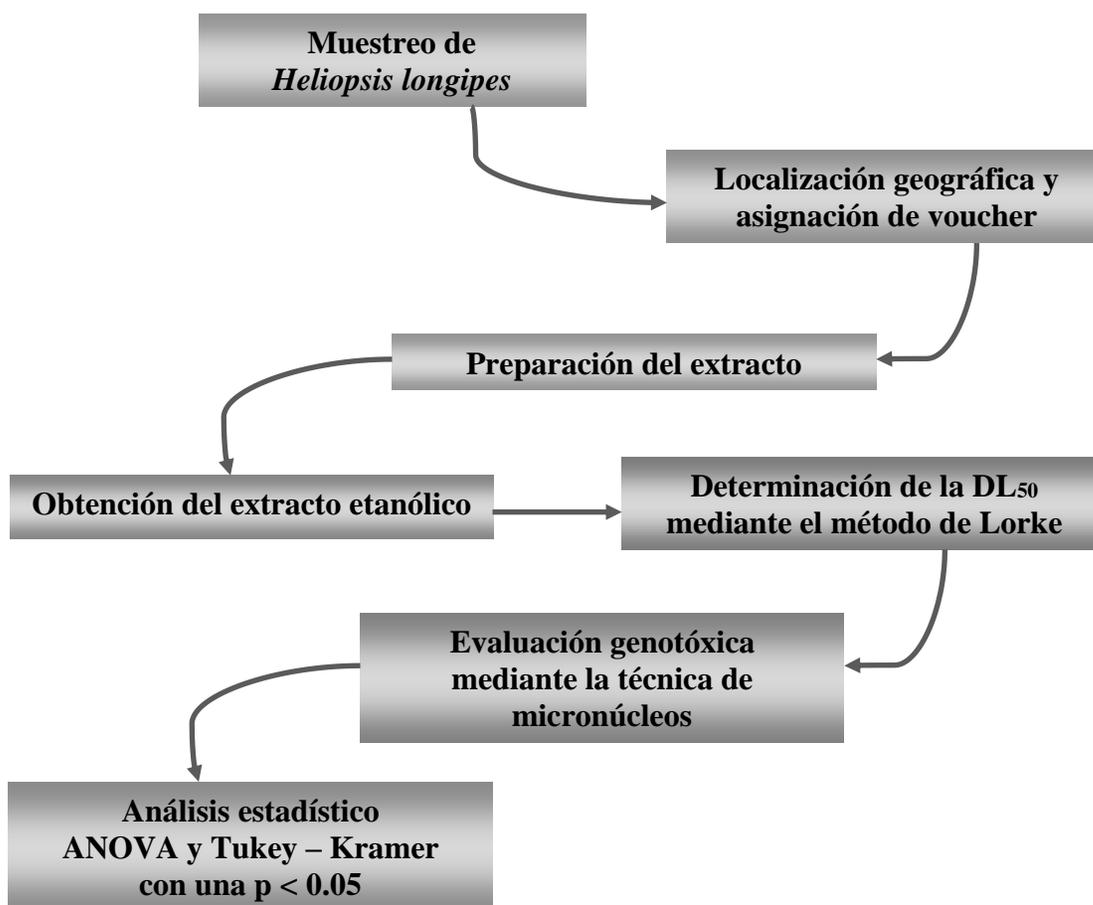
- Obtener el extracto etanólico de las raíces de *Heliopsis longipes*.
- Determinar la DL<sub>50</sub> del extracto etanólico de las raíces de *Heliopsis longipes* mediante el método de Lorke.
- Evaluar el efecto genotóxico del extracto de las raíces de *Heliopsis longipes* mediante el conteo de eritrocitos policromáticos micronucleados (EPMN) en sangre periférica
- Determinar el efecto citotóxico del extracto de las raíces de *Heliopsis longipes* mediante la cuantificación de eritrocitos policromáticos con respecto a eritrocitos normocrómicos (EP/EN)

## 5. HIPÓTESIS

- Si el extracto etanólico de las raíces de *Heliopsis longipes* posee capacidad genotóxica y citotóxica, será capaz de dañar el ADN celular, aumentando la frecuencia de eritrocitos policromáticos micronucleados (EPMN), así como la relación de eritrocitos policromáticos/eritrocitos normocrómicos (EP/EN) en sangre periférica.

## 6. METODOLOGÍA

Cuadro 7. Esquema del diseño experimental metodológico.



## **6.1 Obtención del extracto de las raíces de HL.**

Las raíces de HL se encuentran en terrenos áridos y se colectaron en el mes de octubre del 2008 en la región de Río Verde en San Luis Potosí, México, a una altitud de 1795 m sobre el nivel del mar. Después de su identificación, se asignó el voucher a la planta (*H. longipes* 41523) y fue almacenada en el Herbario de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí.

El rendimiento de las raíces secas de HL fue de 820 g y el extracto se obtuvo con un sistema de etanol absoluto (8 L) mediante extracción continua (Tecator, Soxtec System HT1043 Extraction Unit) durante 4 h a 80 °C. El extracto fue filtrado a través de papel Whatman No. 4 y llevado a sequedad por medio de un rotavapor giratorio (Büchi modelo R 3000) a 60 °C bajo presión reducida. La filtración y evaporación del extracto proporcionó un aceite viscoso de color amarillo oscuro (70 g) el cual se mantuvo en un desecador con carbonato de sodio por 12 h, hasta llegar a una constante de peso. El residuo seco fue disuelto en solución salina previa a su administración en los animales.

## **6.2 Animales.**

El experimento se realizó bajo los Lineamientos Estándares Éticos para la Investigación Experimental en Animales (Zimmermann M., 1983), y la Norma Oficial Mexicana para el Cuidado y Manejo de Animales (NOM-062- ZOO-1999). Se utilizaron ratones adultos machos CD1<sup>+</sup> con un rango de peso de 28-34g, fueron obtenidos del Bioterio del Instituto de las Ciencias de la Salud de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. Los ratones fueron mantenidos bajo control de temperatura ( $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ) con ciclos de 12 h de luz/obscuridad y humedad ( $55 \pm 10\%$ ) provistos de alimento y agua. Doce horas antes del experimento se mantuvieron en ayuno solamente con libre acceso a agua. Al terminar el experimento fueron sacrificados por medio de dislocación cervical.

### 6.3 Reactivos.

- Se prepararon soluciones de extracto de *Heliopsis longipes* de 0.6, 0.7, 1.8 y 7 mg/ml para la administración oral de 1, 10, 30 y 100 mg/kg, respectivamente.
- Daunorrubicina (Rubilem), adquirida por Laboratorios Lemery (Ciudad de México, 97% de pureza), frasco ampula con liofilizado conteniendo: Clorohidrato de Dau equivalente a 20 mg de daunorrubicina: se disolvió en 1 mg/ml de agua destilada.
- Fosfato de potasio, fosfato de sodio, metanol y formaldehído fueron comprados en J. T. Baker (Ciudad de México).
- Giemsa SIGMA (St. Louis, MO, USA).
- La solución buffer de fosfatos 0.3 M en H<sub>2</sub>O desionizada y se ajustó a un pH de 6.8.
- La solución para teñir se compuso 5 ml de la solución buffer, 2 ml de Giemsa y 43 ml de H<sub>2</sub>O desionizada.

### 6.4 Aparatos y equipo.

- Equipo de extracción Soxhlet
- Rotavapor (Buchi modelo R 3000)
- Microscopio Óptico (Olympus CX21FSI)
- Papel Whatman No. 4
- Contador de células, vortex (Mixer 16700)
- Refrigerador ( Daewood)
- Báscula analítica (VIBRA)
- Báscula para pesar ratones
- Matraz, probeta graduada, embudo, pipetas, laminillas, vasos coppel.
- Material para montar el equipo Soxhlet: refrigerante, matraz balón de fondo plano, mangueras, soporte universal, pinzas para soporte, mantilla de calentamiento, regulador de temperatura, bomba de agua, embudo de extracción, vasos de precipitado, varilla de vidrio, perlas de vidrio.

## 6.5 Determinación de la DL<sub>50</sub>.

La dosis letal media (DL<sub>50</sub>) corresponde al efecto dañino de un agente químico o un fármaco sobre un organismo vivo. La Organization for Economic Cooperation and Development (OECD) define la toxicidad aguda como los efectos adversos que se ocasionan en un corto tiempo de administración ya sea en una sola dosis o en varias dosis suministradas en 24 h.

Aún con un número amplio de animales existen variaciones considerables en la precisión del ensayo debidas a los factores tales como: sexo, especie, cepa, edad, dieta, estado nutricional, condiciones generales de salud, procedimientos experimentales, ruta de administración, estrés, formulación de la dosis y la variación intra e inter-laboratorio. Por lo tanto la DL<sub>50</sub> no puede ser vista como una constante biológica, a través de la normalización de los ensayos en los animales y de las condiciones experimentales, la variabilidad puede ser reducida pero nunca eliminada (Cariño R. 2002).

La toxicidad aguda de las raíces de HL Se determinó mediante el método de Lorke (ver cuadro 8), para lo cual se emplearon ratones machos de la cepa CD1<sup>+</sup> con un peso de 28 a 34g, los cuales se observaron por 7 días antes de iniciar el experimento, manteniéndolos con libre acceso a agua y alimento. Se distribuyeron en lotes de 3 ratones cada uno, se les administró en la primera fase por vía oral la dosis de 10, 100 y 1000 mg/kg del extracto crudo de las raíces de HL, más un grupo control administrado únicamente con solución salina fisiológica de cloruro de sodio (SS) (0.9%). Los animales se observaron por un periodo de 14 días, se registró mortandad de 2 animales en la dosis de 1000 mg/kg, en vista de lo anterior, se procedió a administrar el extracto de HL por la misma vía a otros 4 grupos de animales, las dosis de 200, 400, 800 y 1600 mg/kg, así como el control con SS., respectivamente (Lorke, D. 1983). Finalmente, el peso de los animales fue monitoreado durante el experimento y registrada la muerte de los animales. La DL<sub>50</sub> fue determinada por la media geométrica, en la cual se halló 0/3 y 3/3 muertes encontradas y se realizó con la siguiente fórmula:

$$DL_{50} = \sqrt[2]{200 \times 400} = 282.8 \text{ mg/Kg.}$$

**Cuadro 8. Determinación de la dosis a tratar en la fase II del método de Lorke para el cálculo de la dosis letal media (DL<sub>50</sub>).**

Número de animales muertos en				Dosis a elegir (mg/kg)			
Etapa I				Etapa II			
Dosis Grupo	10 mg/kg	100 mg/kg	1000 mg/kg	282.8 mg/kg		mg/kg	
1	0	0	0	1600	2900	5000	
2	0	0	1	600	1000	1600	2900
<b>3</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>2</b>	<b>200</b>	<b>400</b>	<b>800</b>	<b>1600</b>
4	0	0	3	140	225	370	600
5	0	1	3	50	100	200	400
6	0	2	3	20	40	80	100
7	0	3	3	15	25	40	60
8	1	3	3	5	10	20	40
9	2	3	3	2	4	8	16
10	3	3	3	1	2	4	8

### 6.6 Evaluación de la genotoxicidad de *Heliopsis longipes* mediante la técnica de micronúcleos (MN).

Los animales se pesaron y distribuyeron aleatoriamente en 6 lotes con 5 ratones cada uno (ver cuadro 9); al grupo negativo se le administró solución salina por vía oral, al grupo positivo se le administró 4 mg/kg de Dau por vía intraperitoneal y a los 4 grupos restantes se les administró el extracto de HL por vía oral en dosis de 1, 10, 30 y 100 mg/kg utilizando como vehículo solución salina.

Antes de iniciar el ensayo y después de 24, 48, 72 y 96 h de la administración de los compuestos, se cortó aproximadamente 1 mm del extremo terminal de la cola de cada animal para obtener una muestra sanguínea, la cual se colocó directamente en un portaobjetos y se realizó un frotis. Cada laminilla se fijó con metanol absoluto por 3 min a temperatura ambiente; posteriormente se tiñeron durante 15 minutos con 5% de la solución de giemsa diluida en solución buffer fosfato (pH 6.8). Después, las laminillas fueron sumergidas en agua, secadas a temperatura ambiente y observadas en el microscopio. El potencial genotóxico y citotóxico de HL fue determinado por el conteo del número de eritrocitos policromáticos micronucleados en 1000 eritrocitos policromáticos (EPMN/EP) y la proporción de eritrocitos policromáticos en 1000 eritrocitos normocromáticos por ratón, respectivamente (Schmid W., 1975; McGregor J. 1990).

**Cuadro 9. Distribución de los lotes para el ensayo genotóxico.**

No. Lote	Agente	Dosis (mg/kg)
1	Solución Salina	---
2	Dau	4
3	HL	1
4	HL	10
5	HL	30
6	HL	100

**6.7 Análisis estadístico.**

Se realizó el análisis estadístico del estudio genotóxico mediante las pruebas de ANOVA y *t* de Student, utilizando el software Stat 3.0. Las diferencias fueron consideradas estadísticamente significativas con respecto a  $p < 0.05$ .

## 7. RESULTADOS

Los resultados mostraron que la  $DL_{50}$  del extracto total de las raíces de HL fue de 282.8 mg/kg, es decir fue moderadamente tóxica.

Los resultados de la proporción de EPCMN obtenidos en este estudio se muestran en el cuadro 10. Se encontró que el número de micronúcleos inducidos por el extracto de HL se mantuvo sin diferencias significativas con respecto al control a lo largo del experimento (0-96 h). Por el contrario, la administración de Dau, reveló un incremento significativo desde las 24 h posteriores a la administración de la Dau, manteniéndose así a las 48, 72 y 96 h con un 65, 105, 105 y 63% mayor con respecto al control.

**Cuadro 10. Efecto de la administración del extracto de las raíces de *Heliopsis longipes* (HL) en proporción de eritrocitos policromáticos micronucleados (EPMN) en ratones.**

EPMN (Media $\pm$ S. E. M.)						
Tiempo (h)	Control	HL 1 mg/kg	HL 10 mg/kg	HL 30 mg/kg	HL 100 mg/kg	Dau 4 mg/kg
0	2.0 $\pm$ 0.45	0.6 $\pm$ 0.24	2.0 $\pm$ 0.32	2.2 $\pm$ 0.73	1.8 $\pm$ 0.58	2.4 $\pm$ 0.40
24	1.8 $\pm$ 0.37	2.4 $\pm$ 0.51	1.8 $\pm$ 0.49	2.0 $\pm$ 0.63	2.0 $\pm$ 0.63	6.2 $\pm$ 1.07*
48	2.0 $\pm$ 0.55	2.4 $\pm$ 0.51	2.0 $\pm$ 0.63	1.8 $\pm$ 0.49	2.2 $\pm$ 0.37	21.0 $\pm$ 2.10*
72	1.8 $\pm$ 0.58	2.0 $\pm$ 0.55	1.6 $\pm$ 0.40	2.0 $\pm$ 0.63	1.4 $\pm$ 0.24	19.0 $\pm$ 1.30*
96	2.2 $\pm$ 0.37	2.4 $\pm$ 0.50	2.2 $\pm$ 0.37	3.0 $\pm$ 0.45	2.4 $\pm$ 0.60	14.0 $\pm$ 1.50*

Los resultados indicados corresponden al media  $\pm$  S.E.M. de 5 ratones por dosis. Se contaron 1000 eritrocitos policromáticos por ratón.

\* Indica diferencia estadísticamente significativa con respecto al valor del grupo control de acuerdo a la prueba de ANOVA y *t* de Student,  $p < 0.05$ .

Los resultados obtenidos con respecto a los extractos en el presente estudio, demostraron que los niveles inducidos de EPMN por HL fueron similares con respecto al grupo control; por lo tanto los resultados obtenidos no implican un riesgo de genotoxicidad por HL en nuestro modelo utilizado.

La relación de EP/EN de este estudio se muestra en el cuadro 11. En la producción de EP no hubo modificación significativa por parte de HL; sin embargo la administración de Dau aumentó esta relación a partir de las 48 h efecto que se mantuvo hasta las 96 h con un aumento significativo de la eritropoyesis de 54, 54 y 55% respectivamente más con respecto al control. Por lo tanto la Dau es un agente citotóxico en médula ósea de ratón. Con respecto a la administración de HL en las cuatro dosis empleadas fueron similares con respecto al grupo control; por lo tanto los resultados obtenidos no implican un riesgo de citotoxicidad por parte del extracto de HL.

**Cuadro 11. Efecto de la administración del extracto de las raíces de *Heliopsis longipes* (HL) en proporción de eritrocitos policromáticos/ eritrocitos normocrómicos (EP/EN) en ratones.**

EP (Media ± S.E.M.)						
Tiempo (h)	Control	HL 1 mg/kg	HL 10 mg/kg	HL 30 mg/kg	HL 100 mg/kg	Dau 4 mg/kg
0	3.3±0.14	2.9±0.13	3.2±0.07	3.5±0.11	3.1±0.05	3.1±0.23
24	3.6±0.25	2.9±0.07	3.0±0.15	4.6±0.23	2.8±0.09	2.2±0.13
48	3.9±0.21	3.7±0.14	3.2±0.21	3.7±0.16	3.9±0.15	1.8±0.12*
72	3.7±0.09	4.3±0.18	3.5±0.34	4.7±0.31	3.5±0.89	1.7±0.16*
96	3.8±0.11	3.3±0.38	4.4±0.28	3.7±0.16	4.0±0.26	1.7±0.95*

Los resultados corresponden a la media ± S.E.M. de 5 ratones por dosis. Se contaron 1000 eritrocitos por ratón para determinar la relación EP/EN.

\* Indica diferencia estadísticamente significativa con respecto al valor del grupo control de acuerdo a la prueba de ANOVA y *t* de Student,  $p < 0.05$ .

Hasta el momento no se han encontrado datos que reporten la genotoxicidad del extracto de HL o de alguna planta semejante, este trabajo constituye la primera contribución, sin embargo si se han realizado estudios al componente bioactivo presente en las raíces de HL denominada afinina; la cual es la alcanida responsable de los principales efectos biológicos observados en la raíz, entre los que se pueden considerar la actividad anestésica local, saborizante, insecticida y bactericida; en ensayos preliminares de los compuestos bioactivos de la raíz se ha observado una importante acción inhibitoria de la alcanida de HL, sobre el desarrollo de cultivos *in vitro* de diversos microorganismos, tales como *Escherichia coli*, *Pseudomonas solanacearum*, *Bacillus subtilis* y *Sacharomyces cerevisiae* y algunos hongos fitopatógenos como *Sclerotium cepivorum*, *sclerotium rolfssi* y *Fusarium oxysporum* (Molina y García, 2001), la afinina inhibió el desarrollo de *E. coli* y *S. cerevisiae* en concentraciones por debajo de 25 mg/mL y fueron necesarias altas concentraciones de afinina (15 mg/mL) para inhibir el desarrollo de *P. solanacearum* y *B. subtilis* (Molina y col, 1999). En otro estudio se purificó afinina y por reducción catalítica de esta, se obtuvieron la decamonoenamida y la decamida, este estudio demostró que las insaturaciones presentes en la afinina son indispensables para la actividad biocida contra *P. falciparum* 3D7 y *A. albimanus*. (Hernández y col, 2009). Además, presentó efectos analgésicos significativos mediante diversas técnicas *in vitro* e *in vivo*. (Ríos y col, 2007; Ogura y col, 1982). Por lo cual, las alcanidas son consideradas como compuestos bioactivos y han sido encontradas en *Acmella radicans*, *Echinacea purpurea*, *Achillea millefolium*; las cuales pertenecen a la misma familia que HL la familia Asteraceae; *Capsicum annum* de la familia Solanaceae; *Piper nigrum* perteneciente a la familia Peiperaceae; y otra planta importante es *Zanthoxylum piperifu*, de la familia Rutaceae; cada una de ellas tiene características individuales pero es interesante que sus moléculas bioactivas presentan estructuras químicas relacionadas (Molina y García, 2001; Hegnauer, 1977); las alcanidas presentes en *Piper negrum*, son componentes isomericos de afinina y se ha encontrado que poseen actividad anmutagénica contra la aflatoxina B1 (Singh y col, 1994; Reen y col, 1997) y efectos antitumorales en modelos *in vivo* (Srinivasan, 2007). Las raíces de HL presentan el más alto contenido de afinina, lo que justifica su uso tradicional (García, 2004) desde el punto

de vista terapéutico y alimenticio utilizado en forma de condimento de platillos típicos regionales. Debido a esto, es importante establecer la inocuidad de las especies vegetales y sus metabolitos, tanto a nivel sistémico como específicamente sobre sus posibles efectos sobre el material genético tanto a nivel pre-clínico como clínico.

Se ha sugerido que en un estudio agudo, el monitoreo de la frecuencia de EPMN es el adecuado, en virtud de que estas son células jóvenes producidas y liberadas durante el tiempo del experimento, esto se deduce en los experimentos realizados por McGregor, quien propone que los organismos deben estar con el compuesto a estudiar el tiempo suficiente para alcanzar una condición estable, en la que las células micronucleadas alcancen su máxima frecuencia en el tejido en estudio, dicha frecuencia permanece constante cuando la producción de las células dañadas se equilibra con la pérdida de la misma población celular (McGregor, 1990). En términos cinéticos, el tiempo para obtener el estado estacionario en condiciones de un flujo constante de entrada hacia un compartimiento, está determinado por la velocidad de eliminación de ese compartimiento; en el caso de EPMN su cinética de proliferación está determinada por su lapso de vida; de acuerdo a estos conceptos se ha sugerido que el estado estacionario de los EPMN en la médula ósea se alcanza en aproximadamente dos días después del inicio del tratamiento (Cariño, 2007). Por lo tanto, resulta de gran importancia investigar la capacidad genotóxica y/o protectora de otras especies vegetales o sus metabolitos, tal es el caso del beta-cariofileno (BC) un sesquiterpeno volátil que ha sido detectado como aceite esencial de plantas tales como la *Salvia*, *Artemisa* y *Eugenia*; se ha demostrado que tiene algunas propiedades similares a HL como lo son su capacidad antiinflamatoria y anestésica; en el estudio genotóxico realizado demostró la variabilidad en el número de EPCMN inducidos por el BC lo cual no fue significativo, mientras que por lo contrario, en la administración de la adriamicina (un análogo de la daunorubicina) incrementó en los 4 tiempos posteriores a la administración siendo más alto a las 48 y 72h y disminuyendo el daño a las 72 y 96 h en un 53 y 36% respectivamente (Jasso y col, 2009); se puede observar la coincidencia en los resultados obtenidos respecto al BC y a HL en el presente documento, lo cual refuerza la utilización de esta técnica para evaluar la capacidad genotóxica de extractos

vegetales, así como también la utilización de la Dau y sus análogos empleados para la administración de control positivo en estudios experimentales.

Respecto a HL, hasta el momento se ha reportado que en el año 2004 se realizó la asignación de la patente de HL (US Patent 6746697), elaborando una composición herbaria a base de raíz de HL, presentada en forma de goma de mascar, caramelos y enjuagues bucales, ofreciendo las propiedades para tratar xerostomia, boca seca, incrementar la salivación, mantener o mejorar la higiene oral; además siendo útil como un incrementador y potenciador de sabor (<http://www.patentstorm.us/patents/6746697/claims.html>). Debido a las aplicaciones farmacológicas y alimentarias de las raíces de HL, es importante evaluar su seguridad toxicológica no solamente a nivel del organismo integro sino también a nivel celular y a nivel núcleo para determinar la seguridad de su uso comestible y medicinal; Por esto mismo en el presente estudio se empleó la prueba de micronúcleos (MN) la cual permite evaluar el daño ocasionado por agentes causantes de rezago anafásico durante la mitosis o de compuestos que dañan el material genético provocando rupturas; por lo tanto el método de MN se considera útil y recomendado internacionalmente por la European Economic Community (EEC) y la Organization for Economic Cooperation and Development (OECD) como parte de los requerimientos mínimos para la evaluación de la seguridad toxicológica de nuevos productos farmacéuticos y/o alimentarios, mediante la determinación del daño cromosómico en células anucleadas como los eritrocitos, o bien en el citoplasma de células nucleadas como los linfocitos o las espermatogonias (Cariño, 2007). Sin embargo, resulta necesario evaluar su efecto sobre otros órganos donde las alcanidas pudieran tener un efecto nocivo, por ejemplo, el hígado, riñón y cerebro no solo con esta técnica sino también con otras pruebas como por ejemplo el ensayo cometa o Ames.

## 9. CONCLUSIONES

- La  $DL_{50}$  del extracto etanólico de las raíces de *Heliopsis longipes* administrado por vía oral fue moderadamente tóxico (288 mg/kg) en este modelo experimental.
- Se demostró que el extracto etanólico de las raíces de *Heliopsis longipes* en las dosis empleadas (1, 10, 30 y 100 mg/kg) no fue genotóxico ya que no aumentó la frecuencia de EPMN.
- El extracto etanólico de HL no presentó efecto citotóxico en ninguna de las dosis administradas (1, 10 30 y 100 mg/kg), ya que no modificó la relación de EP/EN.
- La dosis empleada de Dau (4 mg/kg) fue genotóxica y citotóxica en este modelo experimental.

## 10. RECOMENDACIONES

- Este trabajo es una contribución al estudio de *Heliopsis longipes*, sin embargo es necesario realizar más estudios con diferentes técnicas como por ejemplo el ensayo cometa para corroborar los resultados obtenidos, así como efectuar investigaciones en órganos tales como hígado, cerebro y riñón donde las alcaloides presentes en este extracto vegetal pudieran tener o no un efecto nocivo.

## 11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Acosta-Madrid I.I., Castañeda-Hernández G., Cilia-López V.G., Cariño-Cortés R., Pérez-Hernández N., Fernández-Martínez E., Ortiz, M.I. 2009. “Interaction between *Heliopsis longipes* extract and diclofenac on the thermal hyperalgesia test”. *Phytomedicine*. **16**, 336–341.

Afife Mrad D. S., Martinez C., Cardozo C. A. 2004. “Cytotoxy *in vitro* study of the extract of a Colombian flora plant using one cell test”. *Rev. Colomb. of the biotech*. **1**, 31-35.

Aiub C. Stankevics L., Da Costa V., Ferreira F., Mazzei J., Ribeiro da Silva A., Soares de Moura R., Felzenswalb I. 2004. “Genotoxic evaluation of a vinífera skin extract that present pharmacological activities”. *Food Chem. Toxicol.* **42**, 969-973.

Brusick D. 1987. Principles of genetic toxicology. 2ª Ed. Plenum Press. USA. Pp. 41-53.

Cariño, R., 2002. “Evaluación de la actividad antioxidante de la naringina y su capacidad antigenotóxica contra el daño producido por la Daunorrubicina”. Tesis de Maestría realizada en el Instituto Politécnico Nacional (IPN). Pp. 17, 20, 47 y 48.

Cariño, C. R. 2007. Evaluación de la actividad analgésica, antiinflamatoria, antigenotóxica y antioxidante de *Stevia pilosa* y *Stevia eupatoria*. Tesis de Doctorado realizada en el Instituto Politécnico Nacional (IPN). Pp. 21, 79 – 80.

Cilia-López V.G., Aguirre-Rivera R.J., Reyes-Agüero J.A., Juárez-Flores B. 2008. “Etnobotánica de *Heliopsis longipes*”. *Bol. Soc. Bot. Méx.* **83**, 83–89.

Colvard M.D., Cordell G.A., Villalobos R., Sancho G., Soejarto D.D., Pestle W., Echeverri T.L., Perkowitz K.M., Michel J. 2006. “Survey of medical ethnobotanicals for dental and oral medicine conditions and pathologies”. *J. Ethnopharmacol.* **107**, 134–142.

Cruz-Ramírez L. A., Valdez-Morales M., Chacón-López M. A., Rosas-Cárdenas F. y Cruz-Fernández A. 2006. “Mexican crops of agroalimentary importance”. *Adv. in Agr. and Food Bio.* **81**, 35-53.

García-Chávez A., Ramírez-Chávez E., Molina-Torres J. 2004 “El género *Heliopsis* (heliantheae; asteraceae) en México y las alcanidas presentes en sus raíces. *Acta Bot. Mex.* **69**, 115-131.

Gispert M. 1997. “La cultura alimentaria mexicana: fuente de plantas comestibles para el futuro”. *Monograf. Jard. Bot.* **5**, 51-57.

Hegnauer R. 1977. “The chemistry of the Compositae”, eds. by Heywood V.H., Harborne J.B., Turner B.L. Academic Press, New York. Pp. 283–335.

Hernández I., Márquez L., Martínez I., Dieguez R., Delporte C., Prieto S., Molina-Torres J., Garrido G. 2009. “Anti-inflammatory effects of ethanolic extract and alkamides-derived from *Heliopsis longipes* roots”. *J. Ethnopharmacol.* **124**, 649–652.

<http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/e/e4/Daunorubicin.svg/446px-Daunorubicin.svg.png>

<http://www.medicinescomplete.com/mc/merck/current/images/12395235.gif>

<http://www.patentstorm.us/patents/6746697/claims.html>

Ikuma M. E., Henrique M., Izilda F., Do Carmo M., Primila C. R., Campaner L., Aparecida E. 2006. “Investigation of genotoxic and antigenotoxic activities of *Melampodium divaricatum* in *Salmonella typhimurium*”. *Tox. In vitro.* **20**, 361-366.

Jasso D., Álvarez-Golzález I., Madrigal-Bujaidar E. 2009 “Clastogenicity of Beta-Cariophyllene in Mouse”. *Biol. Pharm Bull.* **3**, 520-522

Jiménez N. Londoño J., Arango G. 2005. “Actividad Captadora de Radicales Libres y Citotoxicidad de Plantas Colombianas de la Familia Annonaceae”. *Acta Farm. Bonaerense* **24**, 337- 342.

Klaassen, C. 2001. Casarett & Doull’s. Toxicology. The basic science of poisons. 6a Ed. Mc. Graw Hill. USA. 321-350.

Litle, E. 1948. 1948. “El chilcuague”. *Bol. De la Soc. Bote. De Mex.* **7**; 23-27.

Lorke D. 1983. “A new approach to practical acute toxicity testing”. *Toxicol.* **54**, 275-287.

McGregor J., Wehr C., Henika P., Shelby M. 1990. “The *in vivo* erythrocyte micronucleus test: Measurement at steady state increases assay efficiency and permits integration with toxicity studies. *Fund. Appl. Toxicol.* **14**, 513–522.

Martínez M. 1959. “Plantas útiles de la flora mexicana”. México. Ed, Botas. Pp. 216.

Martino L. 2003. Efecto antígenotóxico de la naringina contra el daño ocasionado por la daunorrubicina *in vivo*. Tesis de Lic. QFB realizada en la Universidad La Salle A. C. Pp. 13-14.

Molina-Torres J., Garcia-Chavez A., Ramirez Chavez E. 1999 “Antimicrobial properties of alkamides present in flavouring plants traditionally used in Mesoamerica: affinin and capsaicin”. *J. Ethnopharm.* **64**, 241-248.

Molina-Torres J., Salgado-Garciglia R., Ramírez-Chávez E., Del-Rio, R. 1996. “Purely Olefinic Alcamides in *Heliopsis longipes* and *Acmella (Spilanthes) oppositifolia*. *Biochem. Syst. Ecol.* **24**, 43–47.

Molina J. y García A. 2001 “Alcamidas en plantas: distribución e importancia”. *Avance y Perspectiva*. **20**, 378-380.

Mizutani H., Tada-Oikawa S., Hiraku Y., Kojima M., Kawanishi S. 2005. “Mechanism of apoptosis induced by doxorubicin through the generation of hydrogen peroxide”. *Life Sci*. **76**, 1439–1453.

Muñoz J. 2001. ¿Cómo se modifica el AND? *Longevidad*. **11**, 31-36.

Neilan T. G., Blake S. L., Ichinose F., Racher M. J., Buys E. S., Jassal D. S., Furutani E., Perez-Sanz M. T., Graveline A., Janssens S. P., Picard M. H., Scherrer-Crosbie M., Bloch K. D. 2007. “Disruption of nitric oxide synthase 3 protects against the cardiac injury, dysfunction, and mortality induced by Doxorubicin”. *J. of the American Heart Ass*. **116**, 506 – 514.

Ng. T. B., Lui F. And Wang Z. T. 2000. “Antioxidative activity of natural products from plants”. *Life Sciences*. **66**, 709-713.

NOM-062- ZOO-1999; Norma Oficial Mexicana para el Cuidado y Manejo de los Animales de Laboratorio.

Ogura M., Cordell G. A., Quinn M. L., Leon C., Benoit P. S., Soejarto D. D., Farnsworth R. 1982. “Ethnopharmacologic studies. I. Rapid solution to a problem - oral use of *Heliopsis longipes* – by means of multidisciplinary approach”. *J. Ethnopharm*. **5**, 215-218.

Paniagua-Pérez R., Madrigal-Bujaidar E., Molina-Jasso D., Reyes-Cadena S., Álvarez-González I., Sánchez-Chapul L., Pérez-Gallaga J. 2009 *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol*. “Antigenotoxic, Antioxidant and Lymphocyte Induction Effects Produced by Pteropodine”. **104**, 222–227.

Pinillos M. A., Gómez J., Elizalde J., Dueñas A. 2003. Intoxicación por alimentos, plantas y setas. ANALES Sis San Navarra. **26**, 243 - 263.

Ramos A. 2004. "Intoxicación alimentaria". *Serv. Inf. de la Bibl. Med. Nac.* **5**, 1.

Reen R.K., Wiebel F.J., Singh J. 1997. "Piperine inhibits aflatoxin B1-induced cytotoxicity and genotoxicity in V79 Chinese hamster cells genetically engineered to express rat cytochrome P4502B1". *J. Ethnopharmacol.* **58**, 165-73.

Ribnicky D. M., Poulev A., O'Neal J., Wnorowski G., Malek D. E., Jäger R., Raskin I. 2004. "Toxicological evaluation of the ethanolic extract of *Artemisa dracuncululus* L. for use as a dietary supplement and in functional foods". *Food and Chem. Tox.* **42**, 585-598.

Rios Maria Y., Aguilar-Guadarrama A., Gutierrez M. 2007 "Analgesic activity of affinin, an alkalamide from *Heliopsis longipes* (Compositae)". *J. Ethnopharm.* **110**, 364-367.

Rodríguez C., Díaz J., Semedo J., Silva J., Ferraz A., Picada J. 2009. "Mutagenic and genotoxic effects of *Baccharis dracunculifolia* (D.C.)". *J. Ethnoph.* **124**, 321-324.

Schmidt W. 1975. "The micronucleus test". *Mutat. Res.* **1**, 9-15.

Singh J., Reen R.K., Wiebel F.J. 1994. "Piperine, a major ingredient of black and long peppers, protects against AFB1-induced cytotoxicity and micronuclei formation in H4IIEC3 rat hepatoma cells." *Cancer Lett.* **86**, 195-200.

Srinivasan K. 2007. "Black pepper and its pungent principle- piperine: a review of diverse physiological effects". *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **47**, 735-748.

Valle P. y Florentino B. L. 2000. "Toxicología de alimentos". *Inst. Nac. Inst. de Sal. Pub. Cent. Nac. de Sal. Amb.* 56-63.

Villavicencio M. A., Pérez B. E., Mendoza E. 2008. "Citotoxicidad en células Hela de tres especies de plantas medicinales de Hidalgo, México". *Polibotánica*. **26**, 137-147.

Wienstein D.M., Mihm M. J., Bauer J. A. 2000. "Cardiac peroxynitrite formation and left ventricular dysfunction following Doxorubicin treatment in Mice". *The J. of Pharm. and Experimt. Therap.* **294**, 396 - 401.

Zimmermann M. 1983. "Ethical guidelines for investigation of experimental pain in conscious animals". *Pain*. **16**, 109–110.

## WESTERN PHARMACOLOGY SOCIETY

**52<sup>nd</sup> Annual Meeting**  
**February 8<sup>th</sup> – February 12<sup>th</sup>, 2009**  
**Grand Hotel Acapulco & Convention Center**  
**Acapulco, Mexico**



Meeting Organizer: Carlos M. Villalón

Meeting Coordinator: Iain Buxton

### 2008 – 2009 WPS Officers

President	Carlos M. Villalón
President-Elect	Larry Brunton
Immediate Past President	Lubo Zhang
Secretary	Linda Hedley
Treasurer/Editor	Iain Buxton
Councilor for Electronic Communications	Nigel Shankley
Councilor for Student Affairs	Michael Pugsley

**W37 EVALUATION OF THE ANALGESIC AND GENOTOXIC EFFECT OF *Heliopsis longipes* S.F. Blake IN VIVO**

\*Cariño-Cortés, R., Cilia-López, G.V., Moreno-Martínez, R.E., Fernández-Zuñiga, K. and Rivera-Garnica, L. Health Sciences Institute, Autonomous University of the State of Hidalgo and Autonomous University of San Luis Potosí, Mexico ([raquelquim@gmail.com](mailto:raquelquim@gmail.com))

*Heliopsis longipes* S.F. (HL) Blake known as chilcuague is a perennial herb endemic to Sierra de Álvarez and Sierra Gorda of Mexico. This plant was used by the Nahuatl civilization as a flavoring in the food preparation. The root is used in traditional medicine as analgesic in pain toothache and to prepare homemade an insecticide which gave a paralyzing effect and had toxicity like pyrethrins. Chewing of a little piece of stem from this plant produces intense salivation and a local analgesic effect. However, there is a lack of studies that document the traditional uses. Therefore, the aim of the present study was to examine the possible antioxidant effect *in vitro*, anti-nociceptive and mutagenic affect of ethanolic extracts obtained of root of HL in the mice CD1+ using the hot plate, writhing and micronucleous tests. The results showed that DL50 value estimated for the Lorke method was of 288 mg/kg *p.o.* In the study anti-nociceptive study, the extract caused 9.48% and 26.78% inhibition ( $P < 0.05$ ) against acetic acid-induced abdominal constrictions at doses of 3 y 10 mg/kg respectively. The results of the hot plate test in mice showed that the HL (3 and 30 mg/kg, *p.o.*) increased significantly the reaction time since T15 to T90. On the other hand, the extract not produced genotoxic damage, but showed that produced citotoxic damage since T96. Finally, we not found effect of extracts (62.5 to 2000 ppm) on the DPPH radical scavenging activity. Also, further studies are required to fractionate the extracts, and to identify theirs analgesic components.

**W38 EVIDENCE-BASED REVIEW OF GABAPENTIN FOR TREATMENT OF OFF-LABEL CONDITIONS**

Martínez, T.T., Martínez, R.R. Toxicologic Associates Inc, Richmond Heights, MO 63117 ([terrymartinez@rocketmail.com](mailto:terrymartinez@rocketmail.com))

Gabapentin originally was approved by the U.S. Food and Drug Administration in 1994 for use as an adjunctive medication to control partial seizures. In 2002, an indication for treatment of post-herpetic neuralgia was added. In 2004, Warner-Lambert plead guilty and agreed to pay \$430 million to settle charges that they were marketing their brand of gabapentin (Neurontin) for off-label (not FDA-approved) purposes. Gabapentin is still prescribed extensively off-label, principally for treating some types of chronic pain. Gabapentin is not effective for acute pain. Evaluation of systematic reviews and randomized controlled trials shows a spectrum of effectiveness, with scientific support for some off-label uses and lack of evidence for others. Using the following scale for efficacy, (good ++, some +, mixed +/-, no convincing evidence 0, made worse -) our findings were:

neuropathic pain (++ to 0, i.e. diabetic neuropathy ++ to trigeminal neuralgia 0), epilepsy as monotherapy (+), migraine headache prophylaxis (+), restless legs syndrome (+), essential tremor (+/-), drug or alcohol withdrawal (+/-), reflex sympathetic dystrophy (0), attention deficit disorder (0 or -), and bipolar disorder (0 or -)

The use of gabapentin to treat non-approved diagnoses carries inherent risks for the patient, the physician, and the pharmaceutical manufacturer.

**Ácido Desoxirribonucleico (ADN):** Material genético de todos los organismos celulares. La molécula de ADN tiene la estructura de una escalera formada por azúcares, fosfatos y cuatro bases nucleótidas: adenina (A), timina (T), citosina (C) y guanina (G). El código genético queda determinado por el orden de estas bases, y cada gen tiene una secuencia única de pares de bases.

**Cáncer:** El Cáncer es el nombre de las enfermedades en las cuales células anormales se multiplican sin control. Las células cancerosas pueden invadir los tejidos vecinos y pueden diseminarse a través del torrente sanguíneo y el sistema linfático a otras partes del cuerpo.

**Citotoxicidad:** Efecto de un agente sobre la integridad celular produciendo la muerte de la célula.

**Eritrocito:** Es el elemento más maduro de la eritropoyesis. Su misión fundamental es la captación de oxígeno y su transporte a los tejidos. Los eritrocitos son elementos anucleados, de color Rosado y de forma redondeada u oval, con una depresión o zona más clara en el centro.

**Eritrocito Normocrómico:** Eritrocito maduro, célula que ha perdido un ácido ribonucleico y mitocondrias.

**Eritrocito Policromático:** Eritrocito joven, presenta un ácido ribonucleico y mitocondrias.

**Eritropoyesis:** Proceso de formación de eritrocitos o glóbulos rojos.

**Genotoxicidad:** Efecto producido por un agente que daña el material genético.

**Intoxicación Alimentaria:** Intoxicación provocada por cualquier alimento o producto alimenticio que por contener sustancias tóxicas, gérmenes, metales, aditivos, hormonas, etc., que provocan una intoxicación no solo a nivel del organismo, sino también a nivel celular.

**Micronúcleo:** Se define como un fragmento cromosómico acéntrico o cromosoma completo que sufre un rezago anafásico, lo cual se traduce en la aparición de un núcleo pequeño en el citoplasma de las células nucleadas y anucleadas.

**Mutación:** Cambios al azar en la cantidad, cualidad y arreglo de los genes en las replicaciones celulares subsecuentes, y que tiene la posibilidad de manifestarse como una alteración cromosómica y/o como un cambio fenotípico en los organismos afectados.

**Mutagénesis:** Acto de inducir la mutación. Las pruebas de mutagénesis que se realizan durante las investigaciones pre-clínicas de un nuevo fármaco constituyen una serie de de ensayos “*in vitro*” e “*in vivo*”.

**Mutagénico:** Compuesto o agente que induce mutaciones, como la luz UV o algunos compuestos químicos.

**Toxicidad:** Grado de efectividad de una sustancia tóxica.

**Tóxico:** Cualquier sustancia que incorporada al organismo es capaz de producir graves alteraciones orgánicas o funcionales e incluso la muerte.