

1995-D

COD. 091244594

UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS



EVALUACION DE LA GENOTOXICIDAD DE UN EXTRACTO
DE LA SEMILLA DE *Persea americana* (aguacate).

TESIS PROFESIONAL QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
LICENCIADO EN BIOLOGIA

PRESENTA

LUIS OMHAR GARCIA SALCIDO

Las Agujas, Zapopan, Jal., Junio de 2003



UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS

COORDINACIÓN DE CARRERA DE LA LICENCIATURA EN BIOLOGÍA

COMITÉ DE TITULACIÓN

**C. LUIS OMHAR GARCÍA SALCIDO
P R E S E N T E .**

Manifetamos a Usted que con esta fecha ha sido aprobado su tema de titulación en la modalidad de **TESIS E INFORMES** opción Tesis con el título "**EVALUACIÓN DE LA GENOTOXICIDAD DE UN EXTRACTO DE LA SEMILLA DE *Persea americana* (AGUACATE)**", para obtener la Licenciatura en Biología.

Al mismo tiempo le informamos que ha sido aceptado/a como Director de dicho trabajo el/la **BIOL. EDUARDO PADILLA CAMBEROS** y como Asesor(es) el/la **DR. CARLOS ALVAREZ MOYA**.

**A T E N T A M E N T E
"PIENSA Y TRABAJA"**

Las Agujas, Zapopan, Jal., 18 de marzo del 2003



**DRA. MÓNICA ELIZABETH RÍOS LÓPEZ
PRESIDENTE DEL COMITÉ DE TITULACIÓN**

COORDINACIÓN DE LA CARRERA DE
LICENCIADO EN BIOLOGÍA


**M.C. LETICIA HERNÁNDEZ LÓPEZ
SECRETARIO DEL COMITÉ DE TITULACIÓN**

c.c.p. BIOL. EDUARDO PADILLA CAMBEROS.- Director del Trabajo.

c.c.p. DR. CARLOS ALVAREZ MOYA.- Asesor del Trabajo.

c.c.p. Expediente del alumno

MERU/LHL/mam

C. DRA. MÓNICA ELIZABETH RIOJAS LÓPEZ
PRESIDENTE DEL COMITÉ DE TITULACIÓN
DE LA DIVISION DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AMBIENTALES
DE LA UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA
P R E S E N T E.

Por medio de la presente, nos permitimos informar a Usted, que habiendo revisado el trabajo de Titulación en la modalidad de Tesis, que realizo el pasante: Luis Omhar García Salcido, código 091244594 con el título: Evaluación de la Genotoxicidad de un Extracto de la Semilla de *Persea americana* (aguacate), consideramos que ha quedado debidamente concluido, por lo que ponemos a su consideración el escrito final para autorización de impresión y, en su caso, programación de fecha de examen respectivo.

Sin otro particular, agradecemos de antemano la atención que sirva brindar a la presente y aprovechamos la ocasión para enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE

Las Agujas, Zapopan, Jal., a 28 de Marzo del 2003

Eduardo Padilla Camberos

M.C. EDUARDO PADILLA CAMBEROS
DIRECTOR DEL TRABAJO



COORDINACIÓN DE LA CARRERA DE
LICENCIADO EN BIOLOGÍA
SINODALES

Carlos Alvarez Moya
DR. CARLOS ALVAREZ MOYA
ASESOR

M.C. MARIO RUIZ LOPEZ

M.C. PATRICIA CASTRO FELIX

DRA. GALINA PETROVNA ZAITSEVA

SUPLENTE: DR. DANIEL ORTUÑO SAHAGUN

Mario Ruiz Lopez

Patricia Castro

Galina Zaitseva 31.05.05

Daniel Ortuño Sahagun

El presente trabajo fue realizado en la División de Patología y Biotecnología Ambiental del Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C.

Director de tesis: M.C. Eduardo Padilla Camberos

AGRADECIMIENTOS

Gracias a Dios por darme la vida, salud y permitirme alcanzar una de mis metas.

Agradezco profundamente a mis padres -que también son mis amigos-, el haberme formado como persona y darme la mejor herencia, que es la educación. Sin su cariño, comprensión y apoyo no existiría este trabajo, mi educación, ni la persona que soy. Nuevamente gracias, Esperanza y José Luis.

A mis hermanos por aguantarme, aconsejarme y brindarme su apoyo incondicional. Gracias Alejandro y Daniel.

A Eduardo que antes que ser mi director de tesis es un gran amigo -como pocos-, y que sin su ayuda y apoyo este trabajo no sería posible. Gracias Eduardo.

A mi asesor Carlos, que también fue uno de mis mejores maestros de la carrera. Gracias.

Gracias a mis sinodales: Daniel, Patricia, Galina y Mario.

Este trabajo esta dedicado, a la maravillosa persona que es:

Mi compañera

Mi amiga

Mi novia

Y próximamente mi Esposa

El amor de mi vida. . . .

E l i z a b e t h

INDICE DEL CONTENIDO

	Pág.
1. RESUMEN	1
2. INTRODUCCION	2
3. MARCO TEORICO	3
3.1. Aspectos comerciales y de cultivo del Aguacate.	3
3.2. Antioxidantes.	5
3.3. La semilla de aguacate como fuente de antioxidantes.	11
3.4. Riesgos a la salud de los productos naturales.	12
3.5. Importancia del daño genético.	13
3.6. Métodos para evaluar genotoxicidad.	15
3.7. Prueba de micronúcleos.	19
4. JUSTIFICACIÓN	22
5. OBJETIVO	24
6. HIPOTESIS	25
7. MATERIALES Y METODOS	26
7.1. Materiales.	26
7.2. Prueba de toxicidad aguda.	27
7.3. Prueba de genotoxicidad.	29
7.4. Análisis de resultados.	33
8. RESULTADOS Y DISCUSION	34
8.1 Toxicidad aguda.	34
8.2 Prueba de genotoxicidad.	36
8.3 Análisis estadístico.	39
9. CONCLUSIONES	43
10. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	44

INDICE DE CUADROS Y FIGURAS

	Pág.
FIGURAS	
Figura 1. <i>Persea americana</i> (aguacate). Objeto de estudio de este trabajo.	4
Figura 2. Efectos adversos de las alteraciones genéticas.	15
Figura 3. Diagrama de formación de micronúcleos.	21
Figura 4. Animales de experimentación, utilizados en el estudio.	28
Figura 5. Administración del extracto y control negativo por ingestión.	29
Figura 6. Administración del control positivo por vía intraperitoneal.	31
Figura 7. Microscopio de fluorescencia y analizador de imágenes.	32
Figura 8. Gráfica de resultados de la prueba de toxicidad aguda.	34
Figura 9. Eritrocitos teñidos con naranja de acridina (con célula Micronucleada).	38
Figura 10. Eritrocitos teñidos con naranja de acridina.	39
 CUADROS.	
Cuadro I. Resultados de la prueba de toxicidad aguda.	34
Cuadro II. Resultados de la prueba de micronúcleos, en los diferentes grupos de experimentación.	36
Cuadro III. Resultados de la prueba estadística (t de student).	39

1. RESUMEN

La utilización de un extracto vegetal que pretenda utilizarse como aditivo alimenticio requiere de un estudio toxicológico integral, incluyendo los daños genéticos (al consumidor), que permita garantizar su inocuidad, asimismo es un requisito establecido por autoridades a nivel internacional, como la FDA (Food and Drug Administration).

De la semilla del aguacate se han obtenido extractos con una buena perspectiva de utilizarse como antioxidante en los alimentos. El objetivo general del trabajo fue evaluar la genotoxicidad inducida por un extracto de semilla de aguacate, en animales de laboratorio. El estudio genotoxicológico se llevó a cabo mediante la prueba de identificación y cuantificación de micronúcleos en ratones.

La frecuencia de micronúcleos en los grupos de animales dosificados con el extracto de semilla de aguacate no mostró diferencias con respecto al control negativo (vehículo), ($p < 0.01$), por lo tanto se considera que el extracto de semilla de aguacate no muestra actividad genotóxica con la prueba de micronúcleos.

Estos resultados deben considerarse por parte de las agencias regulatorias a fin de establecer márgenes de seguridad, como la Ingesta Diaria Admisible, para la exposición a productos de consumo humano. El extracto de la semilla de aguacate no es genotóxico, lo cual permite continuar su desarrollo como antioxidante.

2. INTRODUCCIÓN

Los seres vivos están expuestos a la acción de numerosos agentes potencialmente tóxicos, que pueden encontrarse en el ambiente, incluyendo los alimentos que se consumen. El origen de estos agentes puede ser físico, como las radiaciones; químicos o biológicos y provocar efectos fisiológicos y en algunos casos efectos de tipo genético.

La acción genotóxica de los agentes repercute de manera directa en la salud del hombre, al ocasionar alteraciones en el material genético que pueden manifestarse en el mismo individuo, como en el caso del proceso de desarrollo de tumores, conocido como carcinogénesis, o bien los efectos pueden manifestarse en la descendencia de los individuos con efectos como los teratogénicos (malformaciones en recién nacidos) (Alia *et al.* 1992).

La identificación oportuna de agentes con potencial genotóxico es una herramienta que permite, establecer un consumo seguro de sustancias que tendrán un contacto directo con la población humana, como los alimentos.

Actualmente, existe una tendencia hacia la utilización de productos naturales en la alimentación, lo cual no necesariamente implica la inocuidad de estos productos. Por tal motivo, en varios países se están estudiando los posibles efectos genotóxicos de los aditivos alimenticios, tanto de origen natural como sintético, para cumplir con la normatividad y garantizar la seguridad en su consumo.

Este trabajo está enfocado primordialmente a la evaluación de los daños genéticos que pudiera provocar el extracto de semilla de aguacate, considerando que existen otro tipo de estudios de seguridad que deberán realizarse en etapas posteriores.

3. MARCO TEORICO

3.1. Aspectos comerciales y de cultivo del Aguacate.

El aguacate es un fruto de tipo perennifolio en forma de piramide que se cultiva en zonas de clima cálido o templado. Fray Bernardino de Sahagún, en 1569, afirmó que el aguacate es nativo del Sur de México (Ochse et al, 1986; De Luna y Flores, 1994; SAGAR, 1996). Pertenece a la familia Lauraceae y el nombre científico es *Persea americana* Mill (Hernández y Gally, 1981; Ochse et al, 1986).

El fruto del aguacate es una baya (mesocarpio y endocarpio carnosos). El pericarpio consiste en tres capas, exocarpio (cáscara), mesocarpio (pulpa), y endocarpio junto a la cubierta seminal. El endocarpio se compone de pocas capas de parénquima de células aplanadas tangencialmente que a menudo se adhieren a la testa (Barrientos, 1996)

La semilla de aguacate está compuesta por cubierta seminal y embrión, carece de endospermo en la madurez y el color de la cubierta seminal lo dan los taninos. El eje embrionario esta formado por la plúmula, hipocotilo y radícula, así los cotiledones y el eje embrionario forman el embrión (Barrientos, 1996).

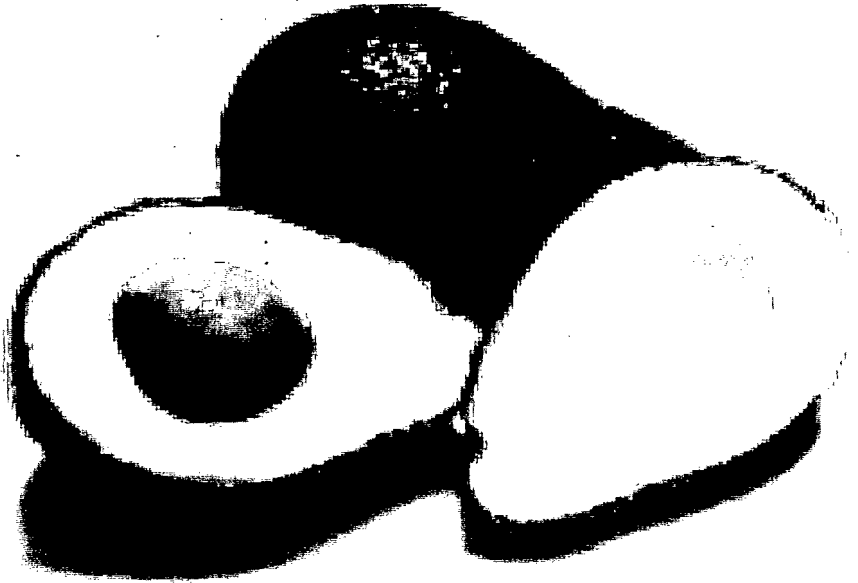


Figura 1. *Persea americana* (aguacate). Objeto de estudio de este trabajo

En México, el principal estado productor de aguacate es Michoacán, en donde existen 87 empacadoras habilitadas para recibir y procesar el aguacate en diferentes formas. De estas empacadoras una de ellas está dedicada exclusivamente a la exportación, 41 empacadoras cuentan con instalaciones que les permite atender el mercado de exportación y sus excedentes al mercado nacional, mientras que las otras 45 solo se dedican al mercado nacional (SAGAR, 1996). En 1996 Michoacán llegó a producir 681,584 Ton. (De Luna y Flores, 1994; SAGAR, 1996).

En 1992 el aguacate fue el mejor situado, en relación de frutas, a nivel mundial y es de suma importancia para México por los ingresos económicos que propicia (INEGI, 1994).

Existen datos de la SAGAR (INEGI, 1994) en los que se menciona que el consumo anual nacional, de aguacate durante el periodo de 1990 a 1995, fue en promedio de 719,760 Ton. La producción en 1994 fue de 799,929 Ton (SAGAR; 1996) y se industrializó al menos el 3% (23.997.87 Ton), si se considera que del porcentaje industrializado la semilla representa el 15%, entonces la cantidad de semilla desechada en ese año fue de 3,790 Ton aproximadamente.

Sin embargo durante el proceso de comercialización y/o industrialización del aguacate lo que se aprovecha en extenso es la pulpa, mientras que la semilla es desechada sin ser procesada confinándose a los basureros tal cual, o como pasta, dependiendo del proceso que se siga en la industrialización del fruto.

La información sobre la industrialización del fruto del aguacate refleja un problema importante: la semilla tirada a la basura es un foco problemático de salud y espacio para quienes tienen que vivir con ella a su alrededor. Por lo tanto resulta de vital importancia el darle un aprovechamiento integral al fruto. En fechas recientes se ha utilizado la semilla del aguacate, para obtener algunos extractos para alimentos; de esta manera se utiliza también la semilla y así se aprovecha el fruto completo (Ramos, 1999).

3.2. Antioxidantes.

Desde hace varios años se ha puesto de moda en Occidente el incremento del consumo de vegetales con el propósito de disminuir la incidencia de enfermedades como el cáncer y la arterosclerosis. Este enfoque de la dieta preventiva se ha completado con el de un *estilo de vida sano*, en lo que podría conceptuarse como un regreso a "lo verde".

Son varias las causas de este retorno: los resultados de innumerables estudios epidemiológicos de los que se infiere el valor protector de ciertas plantas y ejercicios, el redescubrimiento de prácticas ancestrales en regiones del Asia,

como el Tibet y la fascinación que eso produce en quienes quieren vivir más y mejor, pero sobre todo debido al fracaso del modo de vida (en lo que se incluye la dieta y la práctica médica) occidental en la disminución de las enfermedades arriba mencionadas y otras a las que no sin razón se les llama "del desarrollo".

La creciente aceptación de la dieta como terapia preventiva y de la medicina verde como alternativa, está acompañada del desconocimiento (y en consecuencia la falta de estímulo para su estudio) de los agentes presentes en ellas que contribuyen con un amplio espectro de propiedades a la prevención de ciertas enfermedades. Uno de estos grupos son los antioxidantes.

En la industria de los alimentos, los antioxidantes previenen la oxidación de las grasas, la cual es la forma de deterioro de los alimentos más importante después de las alteraciones producidas por microorganismos. La reacción de oxidación es una reacción en cadena, es decir, que una vez iniciada, continúa acelerándose hasta la oxidación total de las sustancias sensibles. Con la oxidación, aparecen olores y sabores a rancio, se altera el color y la textura, y desciende el valor nutritivo al perderse algunas vitaminas y ácidos grasos poliinsaturados. Además, los productos formados en la oxidación pueden llegar a ser nocivos para la salud.

La industria alimentaria ha evitado la oxidación de los alimentos mediante diferentes técnicas, como el envasado al vacío o en recipientes opacos, pero también utilizando antioxidantes. La mayoría de los productos grasos tienen sus propios antioxidantes naturales, aunque muchas veces estos se pierden durante el procesado (refinado de los aceites, por ejemplo), pérdida que debe ser compensada.

Los alimentos vegetales son en general más ricos en sustancias antioxidantes que los animales. También otros ingredientes, como ciertas especias, pueden aportar antioxidantes a los alimentos elaborados con ellos.

Por otra parte, la tendencia a aumentar la poliinsaturación de los ácidos grasos grasos de la dieta como una forma de prevención de las enfermedades coronarias hace más necesario el uso de antioxidantes, ya que los ácidos grasos poliinsaturados son mucho más sensibles a los fenómenos de la oxidación.

Los antioxidantes pueden actuar por medio de diferentes mecanismos:

- a)- Deteniendo la reacción en cadena de oxidación de los ácidos grasos.
- b)- Impidiendo o disminuyendo la formación de radicales libres.
- c)- Eliminando el oxígeno atrapado o disuelto en el producto, o el presente en el espacio que queda sin llenar en los envases.

Los que actúan por los dos primeros mecanismos son los antioxidantes propiamente dichos, mientras que los que actúan de la tercera forma se agrupan en la denominación legal de "sinérgicos de antioxidantes", o más propiamente, de agentes quelantes. Los antioxidantes frenan la reacción de oxidación, pero a costa de destruirse ellos mismos. El resultado es que la utilización de antioxidantes retrasa la alteración oxidativa del alimento, pero no la evita de una forma definitiva. Otros aditivos alimentarios (por ejemplo, los sulfitos) tienen una cierta acción antioxidante, además de la acción primaria para la que específicamente se utilizan.

Algunos antioxidantes que actualmente se utilizan en los alimentos son:

El ácido L-ascórbico o vitamina C.

Este se obtiene industrialmente por un conjunto de reacciones químicas y procesos microbiológicos. Sus derivados se utilizan en productos cárnicos y conservas vegetales y en bebidas refrescantes, zumos, productos de repostería y en la cerveza, contribuye a evitar el oscurecimiento de la fruta cortada en trozos y a evitar la corrosión de los envases metálicos. Este antioxidante es una

vitamina para el hombre y algunos animales, y como tal tiene una función biológica propia. Además mejora la absorción intestinal del hierro presente en los alimentos e inhibe la formación de nitrosaminas, tanto en los alimentos como en el tubo digestivo.

Se ha propuesto el uso de dosis altas (varios gramos diarios) de esta vitamina con la idea de que ayudaría a prevenir una multitud de enfermedades, desde el resfriado común hasta el cáncer. No se ha comprobado que estas dosis masivas tengan alguna utilidad, pero sí que no parecen ser peligrosas, al eliminarse el exceso de vitamina C fácilmente por la orina. Por tanto, las dosis, mucho menores, empleadas como antioxidante en los aditivos pueden considerarse perfectamente inocuas. Su utilidad como vitamina tampoco es muy grande en este caso, ya que en gran parte se destruye al cumplir su papel de antioxidante.

Tocoferol.

El conjunto de tocoferoles se llama también vitamina E. No obstante, el uso de tocoferoles como antioxidantes en un alimento no autoriza a indicar en su publicidad que ha sido enriquecido con dicha vitamina.

La cantidad de estas sustancias ingeridas como un componente natural de los alimentos es en general mucho mayor que la que se ingiere por su uso como aditivo alimentario, ya que se utiliza a concentraciones muy bajas. Al aceite de oliva refinado puede añadirse como antioxidante E-307, exclusivamente para sustituir al perdido en el procesado. Se utilizan también en aceites de semillas, en conservas vegetales y en quesos fundidos.

Los tocoferoles abundan de forma natural en los ácidos grasos vegetales sin refinar, y especialmente en los aceites de germen de trigo, arroz, maíz o soja.

Se obtienen industrialmente como un subproducto del refinado de estos aceites (E 306) o por síntesis química. Al ser liposolubles se utilizan en alimentos grasos.

La función biológica de la vitamina E es similar a su función como aditivo, es decir, la de proteger de la oxidación las grasas insaturadas. Aunque es esencial para el organismo humano, no se conocen deficiencias nutricionales de esta vitamina. No obstante, dosis muy elevadas (más de 700 mg de alfa-tocoferol por día) pueden causar efectos adversos.

Galatos de propilo, octilo y dodecilo.

Se usan como antioxidantes alimentarios desde los años cuarenta. Su propiedad tecnológica más importante es su poca resistencia al calentamiento, por lo que son poco útiles para proteger aceites de fritura o alimentos sometidos a un calor fuerte durante su fabricación, como las galletas o los productos de repostería.

Se utilizan, para la protección de grasas y aceites comestibles. También se utilizan en repostería o pastelería, galletas, en conservas y semiconservas de pescado y en queso fundido.

Butil-Hidroxi-Anisol (BHA).

Este antioxidante sintético se utilizó inicialmente en la industria petrolífera. Desde los años cuarenta se utiliza como aditivo alimentario. Solamente es soluble en grasas y no en agua. Resulta muy eficaz en las grasas de fritura, ya que no se descompone o evapora, como hacen los galatos o el BHT, pasando al producto frito y protegiéndolo. Se utiliza para proteger las grasas utilizadas en repostería, fabricación de galletas, sopas deshidratadas, etc. Su seguridad ha sido discutida extensamente. No tiene acción mutagénica, pero es capaz de modular el efecto de ciertos carcinógenos sobre animales de experimentación, potenciando o inhibiendo su acción, en función del carcinógeno de que se trate.

Esto puede estar relacionado con su actividad sobre los enzimas hepáticos encargados de la eliminación de sustancias extrañas al organismo, que activan o destruyen a ciertos carcinógenos. El BHA a dosis elevadas provoca, en la rata, la proliferación anormal de células en ciertos puntos de su tubo digestivo, y lesiones neoplásicas con dosis aún más altas, por un mecanismo no bien conocido. Las diferencias anatómicas hacen que esto no sea extrapolable en su totalidad a la especie humana.

Su utilización está autorizada en la mayoría de los países (CE y USA entre ellos), pero no en otros, por ejemplo Japón. La tendencia mundial es a la reducción del uso de este antioxidante y del BHT (E-321). Usualmente se utiliza combinado con otros antioxidantes, especialmente con el BHT, ya que potencian mutuamente sus efectos.

Butil-Hidroxi-Tolueno (BHT).

Es otro antioxidante sintético procedente de la industria petrolífera reciclado su uso como aditivo alimentario. Se utiliza prácticamente siempre mezclado con el BHA, tiene sus mismas aplicaciones, y , en general, las mismas limitaciones legales.

Esta sustancia no es mutagénica, pero como el BHA, es capaz de modificar la acción de ciertos carcinógenos. Se elimina en la orina combinado a otras sustancias, por una vía metabólica común a muchos otros compuestos extraños al organismo. El BHT a dosis muy altas, produce lesiones hemorrágicas en ratas y ratones, pero no en otras especies animales. Esto puede ser debido fundamentalmente a que interfiere con el metabolismo de la vitamina K, a cuya carencia son especialmente sensibles estos roedores. El BHT, a dosis relativamente altas, afecta la reproducción en la rata, especialmente el número de crías por camada y la tasa de crecimiento durante el período de lactancia. En función de estos datos, la OMS ha rebajado recientemente la ingestión diaria admisible.

Cloruro estanoso.

Puede utilizarse como aditivo exclusivamente para espárragos enlatados, aunque prácticamente no se utiliza. El estaño se absorbe muy poco en el tubo digestivo, lo que contribuye a su escasa toxicidad.

3.3. La semilla de aguacate como fuente de antioxidantes.

Las plantas en general producen varios compuestos a los que se llaman metabolitos secundarios, entre otros, algunos con efectos terapéuticos y se les da el nombre de principios activos (pueden ser sustancias que se encuentran solas o varios compuestos). Las mezclas pueden ser aceites fijos, grasas, ceras, aceites volátiles, resinas, bálsamos, oleoresinas etc., y tienen importancia en las industrias farmacéuticas, cosmética, perfumería y en la de lubricantes (Valencia, 1995).

Uno de los compuestos que ha creado gran interés en su estudio, por los beneficios que pueden aportar son el grupo de los polifenoles. Estos, son un conjunto heterogéneo de moléculas que comparten la característica de poseer en su estructura varios grupos fenolicos; se encuentran en muchas plantas, algunas de uso común y por sus propiedades antioxidantes merecen mayor atención (Hernández y Prieto, 1999).

La semilla de aguacate, es una fuente de mezclas de compuestos polifenólicos (Flavonoides) desde simples (+) catequinas y (-) epicatequinas hasta sustancias altamente polimerizadas. En los extractos del epicarpio se ha reportado la presencia de sustancias con capacidad antioxidante como la l-epicatequina. Gracias a estos compuestos, a la semilla del aguacate se le han atribuido propiedades farmacológicas (Werman y Neeman, 1986).

En algunas investigaciones acerca del aceite de la semilla del aguacate se ha puesto en evidencia su actividad en el tratamiento contra enfermedades del tejido conectivo (Werman et al, 1990). Por otro lado, se sabe que las infusiones de la semilla de aguacate han sido utilizadas desde la época precolombina contra padecimientos tales como dolores musculares, caída del pelo, problemas ginecológicos, contra parásitos, micosis, etc. (Cabrera, 1996; Argueta et al, 1994; Atzin, 1990).

3.4. Riesgos a la salud de los productos naturales.

Toxicidad aguda.

La vasta mayoría de los productos naturales empleados en la preservación de alimentos e inclusive con aplicación terapéutica, no se fundamentan en estudios que demuestren su eficacia, calidad y su seguridad ya que se argumenta que por el hecho de ser de origen natural son inocuos (De Smet, 1995). Sin embargo estudios recientes han demostrado reacciones tóxicas agudas ocasionadas por algunos productos naturales (Edzar, 1998; Perharic et al, 1994; Lin y Ho, 1994).

Se ha reportado el caso de dos perros que se intoxicaron en los Estados Unidos al ingerir aguacate (sufrieron daños en el miocardio); además se han observado casos similares en caballos y otros animales al ingerir este fruto (Vet, 1994).

Genotoxicidad.

Por otra parte, una de las reacciones adversas que no se presentan en corto tiempo, sino debido a la exposición continua, es lo concerniente al daño del material genético de las células (genotoxicidad). La evaluación de la actividad genotóxica de extractos vegetales se ha convertido en una práctica común debido a que la exposición a tales sustancias se realiza a bajas concentraciones, aunque por largos periodos.

El descubrimiento de los efectos ocasionados por la exposición a agentes que dañan el material genético comenzó a partir de 1927, con la demostración del daño genotóxico ocasionado por las radiaciones, posteriormente, se han descubierto diversas fuentes de exposición a agentes genotóxicos, como son algunos pesticidas, fármacos, metales pesados, aditivos de alimentos e inclusive, algunos productos naturales como las aflatoxinas (Rodríguez, 1997).

Algunos ejemplos recientes de estudios de actividad genotóxica de vegetales o sus extractos son los siguientes:

Estudio con la técnica de micro núcleos para evaluar la actividad genotóxica de la pimienta negra *-Piper nigrum-*, (Díaz et al, 1996). Evaluación genotóxica de hierbas orientales, utilizadas para el tratamiento de edemas (Ryu, et al. 1998).

En Cuba se realizó un estudio de la genotoxicidad de extractos de 6 plantas utilizadas en la medicina tradicional (Montero, et al. 2001). Detección de compuestos genotóxicos en extractos de plantas mexicanas (Baez, et al. 2002). Evaluación genotóxica de una planta utilizada para el tratamiento del vitiligo (Varanda, et al. 2002).

Existen algunos compuestos que exhiben actividad anticarcinogénica cuando se administran a dosis bajas, pero actúan como carcinógenos cuando se emplean en dosis mayores, como la capsaicina (Surh y Lee, 1996).

3.5. Importancia del daño genético.

Las alteraciones genéticas, como las mutaciones, son procesos que se presentan en frecuencias muy bajas en la población y representan la fuente natural de variación biológica; son la materia prima básica para la selección natural y la evolución. Sin embargo, el incremento en las tasas de mutación tiene efectos adversos directamente relacionados con la salud humana (Rodríguez, 1997).

**BIBLIOTECA CENTRAL**

La producción de alteraciones hereditarias podría ser el resultado de la exposición crónica a agentes químicos poderosos, aun en concentraciones bajas. Las mutaciones son cambios abruptos heredables en la composición y arreglo de los genes, los cuales están formados por ácido desoxirribonucleico.

La mayoría de las mutaciones producen efectos deletéreos, otros efectos con poca o ninguna consecuencia y otras son ventajosas para el organismo. La magnitud de la proporción espontánea de mutación, la manera en que la selección actúa en las diferentes combinaciones génicas, y el tamaño y la estructura de las poblaciones humanas son suficientes para mantener una fuente rica de variabilidad. Sin embargo, una proporción de mutación grande y artificialmente creada es potencialmente capaz de producir una declinación en la salud genética, a menos que exista una selección grande en contra de los genes mutantes deletéreos. Este tipo de selección ocurre en las poblaciones naturales, pero en las poblaciones humanas la eficiencia de la medicina moderna tiende a reducir la selección en contra de los caracteres deletéreos.

Muchos genetistas creen que los genes constituyen el más preciado bien hereditario, y que cualquier deterioro en su calidad puede producir un decremento en la calidad de vida. El progreso en el control de las enfermedades infecciosas y en los procedimientos para detectar e identificar los desórdenes genéticos han revelado un residuo muy importante de desórdenes genéticos en las poblaciones humanas (Rodríguez, 1997).

Tales desordenes varían según el tipo de célula afectada. Cuando se afectan células germinales (óvulos, espermias y sus precursores) las consecuencias se manifiestan en la descendencia, como algunos tipos de muerte fetal y las llamadas enfermedades genéticas tales como la fibrosis quística, enfermedad de Tay-Sachs, Síndromes Down, Klinefelter y Turner, xeroderma pigmentosa, anemia de Fanconi, entre otros (Lu, 1991).

Por su parte, cuando el daño genético se presenta en células somáticas, el propio individuo puede desarrollar enfermedades, o bien iniciar el proceso canceroso (carcinogénesis). Si el cambio genético se da en las células somáticas del embrión, puede dar origen a malformaciones en el mismo, proceso conocido como teratogénesis (Figura 2).

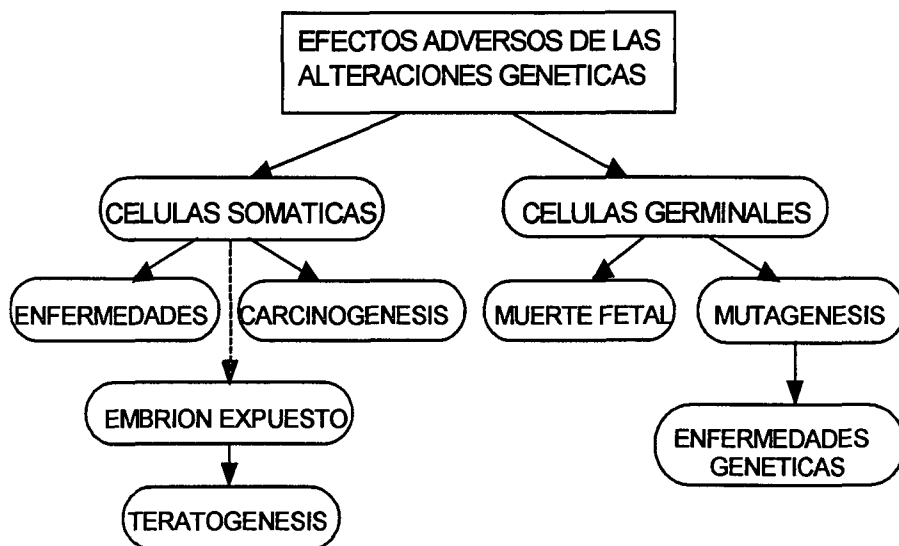


Figura 2. Efectos adversos de las alteraciones genéticas. Modificado de Rodríguez, (1997).

3.6. Métodos para evaluar genotoxicidad.

Las metodologías más empleadas para la evaluación de la genotoxicidad son los ensayos *in vitro*, de corta duración (Vargas et al, 1991). Los sistemas de prueba se idearon con el propósito de evaluar en organismos de bioensayo los efectos producidos por agentes químicos ambientales, a los que el hombre está expuesto.

Las características que debe tener todo sistema de prueba son básicamente la sensibilidad y la capacidad de reproducirse. La sensibilidad de un sistema de prueba se define como la capacidad del sistema para detectar con facilidad y precisión estadística un pequeño efecto mutagénico inducido.

La capacidad de reproducción implica la similitud de respuesta de un sistema en y entre laboratorios. Esto se logra solamente con el establecimiento de protocolos estandarizados y entrenando al personal para que adquiera niveles técnicos competentes. Esta capacidad de reproducción es también deseable en la forma de respuestas similares entre los diferentes sistemas, lo cual permitiría llegar a interpretaciones confiables de los datos positivos y negativos. Sin embargo, las diferencias en cuanto a organización y metabolismo entre procariontes y eucariontes hacen muy difícil la uniformidad en la respuesta (Venitt, 1984).

Con la excepción de algunos virus, el material genético de todos los organismos es el ácido desoxirribonucleico, el cual se presenta en forma desnuda (procariontes) o asociado a proteínas (eucariontes). Las mutaciones son eventos que en principio pueden detectarse en todos los organismos. El significado de una respuesta mutacional se hace más evidente en los organismos cuya genética se conoce extensivamente, ya que la respuesta puede representar uno o varios tipos de alteración genética (Gardner, 1984).

La mutación es por lo tanto un error y consiste en diferentes tipos de cambios del material genético. La severidad de la mutación dependerá tanto de la importancia del gene alterado como de la naturaleza misma de la mutación. Por lo tanto, los diferentes sistemas de prueba deben detectar todo tipo de mutaciones, incluyendo aquellas que tienen efectos menores sobre la función génica. Los tipos de mutaciones que requieren ser detectadas, aunque no necesariamente de manera simultánea son:

- 1) Las mutaciones génicas entendidas como sustituciones de pares de bases, adiciones o supresiones. Las adiciones y supresiones pueden inactivar a un gene, lo que dependerá de la naturaleza misma del gene que se trata. Sin embargo, este tipo de alteraciones permiten al individuo sobrevivir y reproducirse, con lo cual las mutaciones génicas se establecen y se heredan a las siguientes generaciones.

- 2) Las alteraciones en la integridad del DNA. Estas son medibles a través de la formación de aductos (lesiones premutagénicas), ligamientos cruzados intra e interbanda y rompimientos de una o dos hebras. Estas alteraciones pueden ser reparadas enzimáticamente, y si esto ocurre no constituyen mutaciones heredables.

- 3) Los cambios en la segregación cromosómica, lo que provoca cambios numéricos que comúnmente ocasionan una falta de equilibrio genético drástico, y letalidad en las etapas tempranas del desarrollo. Sin embargo, hay cambios numéricos viables, tales como la monosomía (presencia de un solo cromosoma de un par), y la trisomía (presencia de un cromosoma por triplicado).

- 4) Los cambios en la integridad cromosómica o estructurales, que consisten en supresiones, duplicaciones, inversiones y translocaciones. Las supresiones pequeñas, en condición homóciga (alelos idénticos), y las grandes, en condición heteróciga (alelos distintos), son deletéreas y provocan desde el desarrollo de enfermedades genéticas en los individuos afectados hasta letalidad. Los rearrreglos estructurales pueden ser detectados citológicamente, ya que comprenden porciones grandes

de los cromosomas, y en organismos de bioensayo adecuados pueden detectarse cambios en las relaciones de ligamiento (Mendelsohn, 1990).

En la actualidad existen más de 150 sistemas de prueba, donde se emplean microorganismos, plantas, insectos, líneas celulares y modelos animales; aunque solamente se utilizan unos pocos para evaluar agentes químicos ambientales. Entre los más comúnmente empleados se encuentran los que detectan mutaciones, rompimientos cromosómicos (clastogenia) y recombinación mitótica (recombinación en células somáticas). Estos sistemas se utilizan para la detección de mutaciones en células germinales, predicción de la carcinogénesis, investigación de las propiedades bioquímicas de los compuestos y para cumplir con los reglamentos de los organismos reguladores (Venitt, 1984).

Para que un agente químico sea lanzado al mercado debe conocerse antes su toxicidad, su destino ambiental y el uso al que va destinado. Sin embargo, si un agente químico ya está en el comercio deben definirse y cuantificarse los datos en cuanto al riesgo genético que conlleva su uso.

Existen dos formas o aproximaciones para probar agentes químicos:

A) Aproximación en hilera, que es muy utilizada para probar gran número de sustancias.

B) El empleo de una batería de pruebas.

Para el primer caso se emplea una sola prueba que debe ser rápida, confiable y barata. Los agentes son eliminados con base en la respuesta, así que pocas sustancias, las positivas, se dejan para ser evaluadas con pruebas más costosas y definitivas. Con la segunda aproximación se eliminan los agentes no genotóxicos, ya que muestran ser inactivos en todas las pruebas empleadas.

Por definición, un agente genotóxico es aquel que produce una respuesta positiva en cualquier bioensayo que se emplee y que mida cualquier punto genético terminal. Sin embargo, aunque un agente muestre ser genotóxico en un sistema o en una batería de pruebas no por eso representa un riesgo real para la salud, pero sí un riesgo potencial.

Un agente será no genotóxico cuando muestre ser inactivo en cualquier sistema de prueba que mida los diferentes tipos de genotoxicidad.

En última instancia los sistemas de prueba miden la habilidad de una sustancia para producir un efecto genotóxico de tipo cualitativo, de modo que éstos indican un probable riesgo para el hombre.

El análisis de riesgo comprende el desarrollo de estimados cuantitativos de mutaciones transmisibles. Este tipo de pruebas mide el daño en células germinales y los efectos en las progenies de los individuos tratados.

La batería de pruebas seleccionada debe ser capaz de identificar a los agentes que tienen una afinidad específica por el DNA; debe tener una capacidad metabólica apropiada, ser reproducible y transferible entre laboratorios (Venitt, 1984).

3.7. Prueba de Micronúcleos.

La prueba de micronúcleos (MN) detecta el efecto de agentes mutagénicos sobre los cromosomas mediante la identificación de fragmentos acéntricos y/o cromosomas rezagados, que al quedar fuera del núcleo, forman estas estructuras. La prueba permite detectar tanto agentes clastogénicos (que rompen cromosomas) como aneuploidogénicos (que afectan el huso mitótico).

Distintos tipos de lesiones inciden en el mecanismo de inducción de micronúcleos, siendo los más importantes: 1) las mutaciones o alteraciones

mecánicas en las proteínas del cinetocoro, centrómero o aparato del huso mitótico, que pueden proporcionar una desigualdad en la distribución de los cromosomas o en pérdidas de cromosomas en la anafase; 2) roturas sencillas de la cadena de DNA no reparadas o fragmentos acéntricos de cromosomas inducidos tanto endógenamente como por la exposición a un mutágeno; 3) aberraciones complejas como dicéntricos o anillos, entre otros, que pueden dar lugar a micronúcleos (McCarthy y Shugart, 1990).

Esta prueba se utiliza en animales de laboratorio, como: rata, ratón, hámster, primates, larvas de anfibios, peces, aves, invertebrados y plantas.

Entre los biomarcadores de daño genético, la prueba de micronúcleos es ampliamente utilizada por su sencillez y sensibilidad (91%) (Wakata et al., 1998). Los micronúcleos son fragmentos de cromosomas o cromosomas completos que por acción de agentes clastógenos (que rompen cromosomas) o aneuploidogénicos (que afectan el huso mitótico), quedan fuera del núcleo durante el ciclo celular (McCarthy y Shugart, 1990).

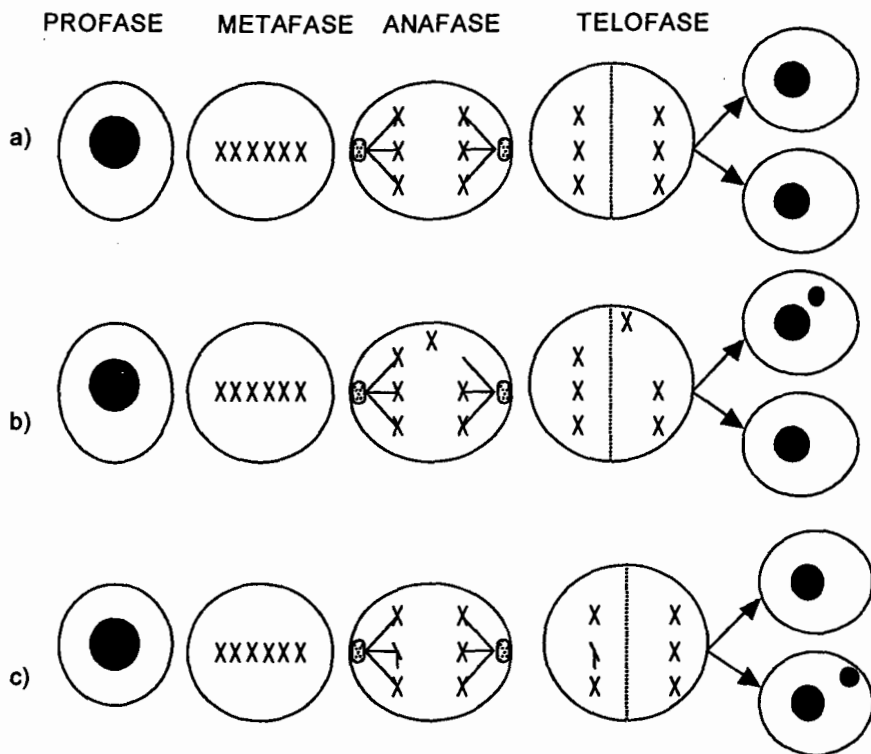


Figura 3. Diagrama de formación de micronúcleos. a) célula normal, b) célula dañada por una agente aneuploidógeno, c) daño ocasionado por un agente clastogénico.

El método utilizado para la tinción de micronúcleos es un punto importante de la prueba a fin de evitar confusiones, por tal motivo es recomendable el utilizar tinciones específicas del DNA, como el colorante a base de Naranja de Acridina (Asano, et al. 1998).

4. JUSTIFICACIÓN

Los alimentos que se consumen actualmente requieren del uso de aditivos para conservar sus características originales, tal es el caso de los antioxidantes que previenen el deterioro del alimento.

Entre las fuentes de sustancias con actividad antioxidante se encuentran algunos vegetales como el aguacate, del cual se han obtenido extractos de la semilla con una buena perspectiva para evitar la oxidación en alimentos.

La mayoría de los productos naturales empleados en la preservación de alimentos, y en la elaboración de sustancias con actividades terapéuticas, no se fundamentan en estudios que demuestren su eficacia, calidad y su seguridad ya que se argumenta que por el hecho de ser de origen natural son benéficos e inocuos (De Smet, 1995). Sin embargo estudios recientes han demostrado reacciones tóxicas agudas ocasionadas por algunos productos naturales (Edzar, 1998; Perharic et al, 1994; Lin y Ho, 1994).

Una de las reacciones adversas que no se presentan en corto tiempo, sino debido a la exposición continua, es lo concerniente al daño del material genético de las células o genotoxicidad, es decir, la inducción de modificaciones en la composición y disposición de las bases nitrogenadas constituyentes del DNA.

La importancia que tiene la genotoxicidad en la salud humana es indiscutible ya que se ha relacionado principalmente con el desarrollo de tumores malignos (carcinogénesis) y efectos en la descendencia (efectos teratogénicos, abortos espontáneos, bajo peso al nacer y otros), cuando son afectadas células somáticas y germinales, respectivamente (Gallo *et al.*, 1987); (Lu, 1991; Hoffmann, 1994).

La utilización de un extracto vegetal requiere de un estudio toxicológico integral que permita garantizar su inocuidad, así mismo es un requisito establecido por las principales autoridades a nivel internacional, tales como la FDA (Food and Drug Administration) y la OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development) (FDA, 1999).

La utilidad práctica de esta investigación debe reflejarse en su consideración por parte de las autoridades correspondientes, para el análisis de información que sustente la aprobación del antioxidante de la semilla de aguacate como apto para utilizarse como aditivo alimenticio.

Este trabajo se realizó como parte de la línea de investigación sobre productos naturales que se desarrolla actualmente en las Divisiones de Transformación de Agre Recursos y la División de Patología y Biotecnología Ambiental. Del Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C. (CIATEJ).

5. OBJETIVO

Evaluar el daño genético inducido por el extracto de semilla de aguacate, en animales de laboratorio.

6. HIPÓTESIS

El extracto de la semilla de *Persea americana* produce toxicidad a nivel genético.

7. MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio genotoxicológico del extracto de semilla de aguacate se llevó a cabo mediante una prueba de identificación y cuantificación de micronúcleos en animales de laboratorio, para lo cual se requirió una prueba de toxicidad aguda, con la finalidad de seleccionar la dosis más adecuada para el estudio de genotoxicidad.

7.1. Materiales.

Material vegetal.

El extracto de semilla de aguacate fue proporcionado por la División de Investigación y Desarrollo Agropecuario del CIATEJ, quienes informaron que se trata de un extracto etanólico obtenido mediante un equipo de reflujo tipo soxhlet y la posterior concentración con rotavapor.

Animales de prueba.

Ratones (*Mus musculus*) adultos machos, con un peso que osciló entre 35 y 42 gramos, de la cepa *Balb-c*, los cuales se obtuvieron del zooterio de la Universidad de Guadalajara.

Reactivos y soluciones.

Solución alcohol-agua 1:1

Uso: Preparación de las diluciones del extracto de semilla de aguacate.

Preparación.- Medir 50 ml. de alcohol etílico y 50 ml. de agua destilada. Mezclar ambos reactivos y almacenar en recipientes protegidos de la luz.

Colchicina (Sigma) 0.32mg/ml

Uso: Control Positivo en la prueba de micronúcleos.

Preparación.- Pesar 0.16 gramos de Colchicina y disolverlos en 50 ml de agua destilada. Transferir 1 ml. a alicuotas de plástico para su almacenamiento en congelación.

Naranja de Acridina (Sigma) 40 µg/ml.

Uso: Tinción de las muestras de sangre periférica.

Pesar 4 mg de Naranja de Acridina y disolverlos en 100 ml de agua destilada.

Almacenar en frasco ámbar bajo refrigeración.

Solución comercial de aerosol "Citospray"

Uso: Fijador de frotis sanguíneo.

7.2. Prueba de toxicidad aguda.

Las pruebas de toxicidad aguda se realizaron de acuerdo a la metodología propuesta por la Comunidad Económica Europea para la Determinación de la Toxicidad Aguda (Comunidad Económica, 1992).

Se utilizaron 6 grupos de 5 animales, para cada grupo de dosificación. Los animales se mantuvieron en condiciones de bioterio, con temperatura, humedad relativa y fotoperíodo controlados; el alimento (nutricubos) y la ingesta de agua se administraron *ad libitum* (figura 4).

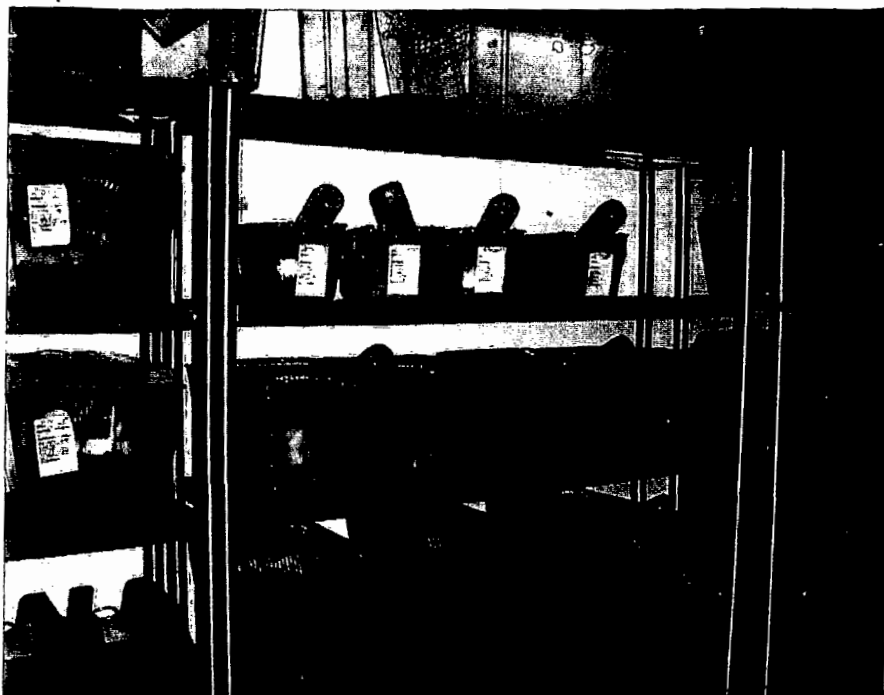


Figura 4. Animales de experimentación, utilizados en el estudio.

El extracto de semilla de aguacate se administró a las dosis de 125 mg/Kg, 250 mg/Kg, 500 mg/Kg, 1000 mg/Kg y 2000 mg/Kg de peso corporal, por vía oral mediante ingestión forzada. Al sexto grupo se le realizó la maniobra de administración con la solución de alcohol-agua empleada como diluyente, siendo este el grupo control (figura 5).



Figura 5. Administración del extracto y control negativo por ingestión forzada.

La observación se realizó diariamente durante 14 días posteriores a la administración de la muestra. El principal parámetro que se evaluó fue el de mortalidad, así como los siguientes parámetros:

Temblores y convulsiones; salivación, diarreas, modificaciones en piel y ojos; letargo, sueño y agresividad; de acuerdo a la metodología establecida por la Comunidad Europea.

7.3. Prueba de genotoxicidad.

La evaluación genotóxica se realizó mediante la determinación de rompimientos cromosómicos, identificados como micronúcleos, en mamíferos (roedores).

El presente método reproduce las directrices del ensayo de micronúcleos en eritrocitos de mamífero, establecido por la Comunidad Económica Europea

(Comunidad Económica, 1992), mismo que concuerda con los métodos de la Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos (EPA) por sus siglas en inglés y la Administración de Drogas y Alimentos (FDA) (FDA, 2000).

La dosis utilizada en la prueba de genotoxicidad fue de 250 mg/Kg de peso corporal, seleccionada en base al resultado de la prueba de toxicidad aguda. Cabe hacer mención que el volumen máximo de sustancia que puede administrarse de una sola vez a los animales de experimentación no debe exceder 2 ml/100 g de peso corporal.

Se utilizaron tres grupos de cinco ratones, incluyendo al grupo de control positivo al cual se le administró Colchicina 4mg/Kg y el grupo de control negativo al cual se le administró el vehículo (solución alcohol-agua 1:1).

La vía de administración de la sustancia de prueba fue por vía oral mediante ingestión forzada, excepto el grupo de control positivo al cual se administró por vía intraperitoneal (figura 6).

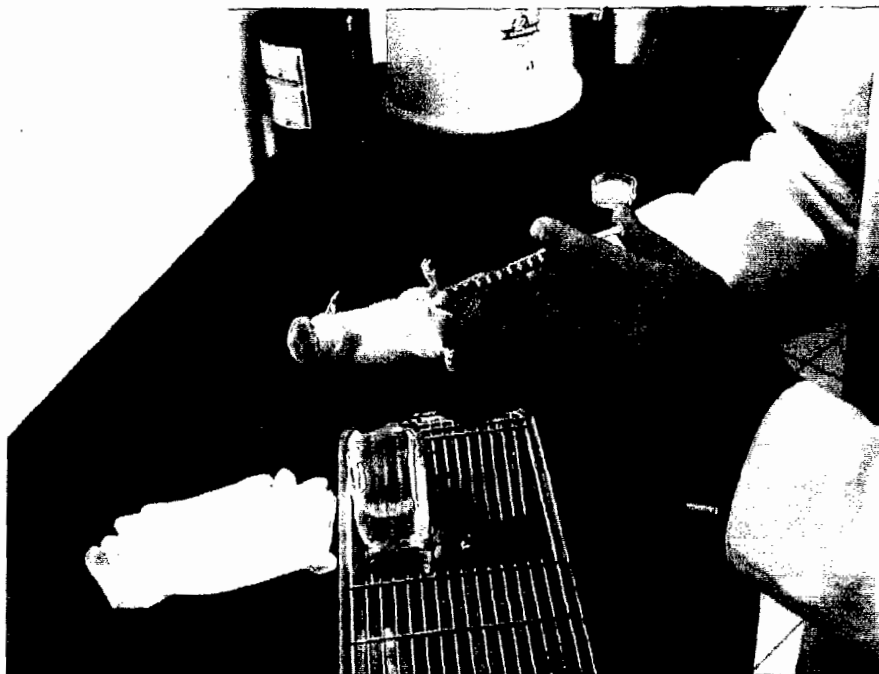


Figura 6. Administración del control positivo por vía intraperitoneal.

El muestreo de sangre periférica se realizó a las 36 horas después de la dosificación. Las muestras de sangre se obtuvieron mediante un corte ligero de la vena de la cola, una gota de sangre se colocó sobre un portaobjetos limpio y desengrasado y se fijó inmediatamente con "citospray", aplicándolo de manera homogénea a una distancia de 15 cm. del portaobjetos y se dejó secar por 5 minutos.

Los portaobjetos con la muestra de sangre fueron teñidos con Naranja de Acridina a una concentración de 40 $\mu\text{g/ml}$, el portaobjetos se cubrió completamente con el colorante y se dejó en contacto por 8 minutos, enseguida se quitó el exceso de colorante con agua destilada, para su posterior observación al microscopio.

Se utilizó un microscopio de fluorescencia (marca Leica). Las observaciones se apoyaron con el empleo de un sistema computarizado de análisis de imágenes (modelo Leica DC100), acoplado al microscopio (figura 7).

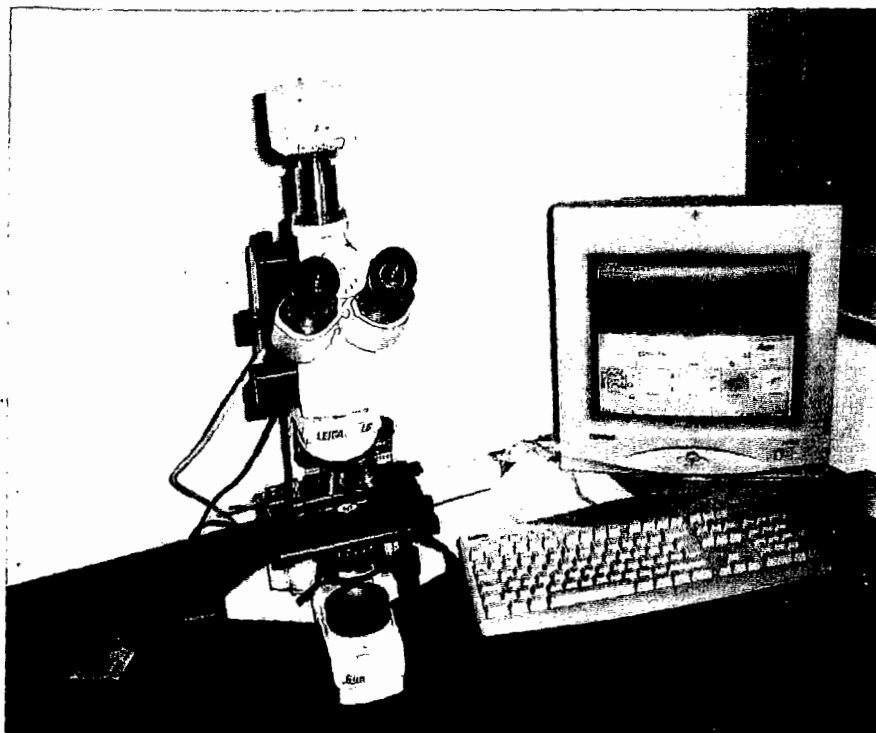


Figura 7. Microscopio de fluorescencia y analizador de imágenes.

Se contabilizaron al menos 1,000 células eritrocitarias por muestra, realizando un "barrido" por toda la muestra en el portaobjetos.

Los criterios para considerar a una célula con micro núcleo, de acuerdo al grupo de trabajo sobre el ensayo de micronúcleos (Kirsch-Volders, et al. 2000), fueron los siguientes:

- El micro núcleo deberá tener un diámetro menor a un tercio del núcleo principal.
- El micro núcleo debe estar separado o ligeramente sobrepuesto con el núcleo principal.
- El micro núcleo debe teñirse de manera similar al núcleo principal.

7.4. Análisis de resultados.

La prueba estadística utilizada fue "t de Student", la cual es un método de análisis estadístico, que compara las medias de dos grupos. Es una prueba paramétrica, o sea que solo sirve para comparar variables numéricas de distribución normal. La prueba aplica para grupos de datos pequeños (menores de treinta).

Se utilizó el paquete estadístico de cómputo SPSS. El valor de t obtenido con este programa se compara con el valor de la tabla de distribución de probabilidad de t, con un coeficiente alfa permitido (α) de 0.01.

Para contrastar la hipótesis estadística se aplica el siguiente criterio: valor de t tabulado mayor o igual que el valor de t calculado, entonces se acepta la hipótesis nula de que los dos grupos son iguales. En caso contrario cuando el valor de t tabulado es menor que el calculado se acepta la hipótesis alterna de que existe diferencia entre los grupos.

8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

8.1. Toxicidad aguda.

En el siguiente cuadro y figura se muestran los resultados de las pruebas de toxicidad aguda.

Cuadro I. Resultados de la prueba de toxicidad aguda.

Concentración del extracto (mg/Kg)	Animales expuestos	Animales sobrevivientes	Animales muertos	Porcentaje de Mortalidad (%)
2000	5	0	5	100
1000	5	0	4	80
500	5	2	2	40
250	5	5	0	0
125	5	5	0	0
0	5	5	0	0

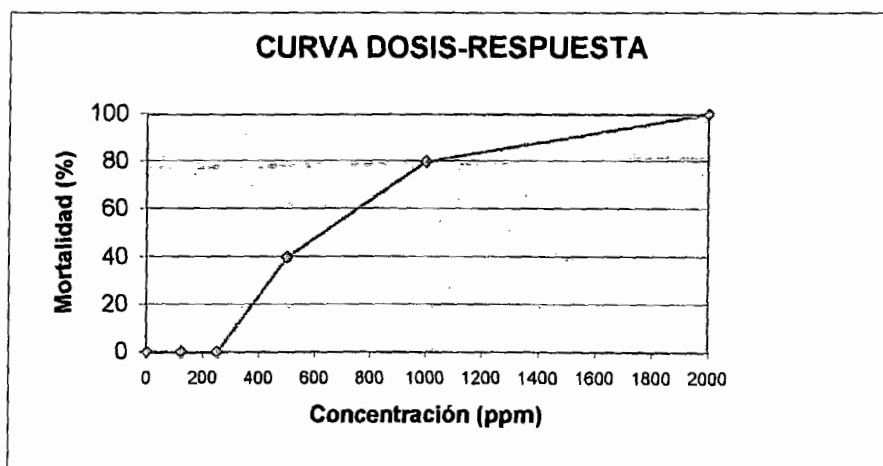


Figura 8. Gráfica de resultados de la prueba de toxicidad aguda.

Estos resultados se utilizaron con la finalidad de seleccionar la concentración que se evaluó en la prueba de genotoxicidad. De acuerdo al grupo internacional de trabajo que evalúa la prueba de micronúcleos, en la prueba deberá utilizarse la máxima concentración que no muestre signos evidentes de toxicidad (Wakata, et al. 1998). Por lo anterior, en este estudio se seleccionó la concentración de 250 mg/Kg para la prueba de genotoxicidad.

Por otra parte, la prueba de toxicidad tiene el propósito de demostrar que el agente de prueba fue utilizado a una concentración suficiente y además que los resultados positivos no fueron ocasionados por la toxicidad, es decir, falsos positivos (Kirsch-Volders, et al. 2000).

8.2. Prueba de genotoxicidad.

En los siguientes cuadros se muestran los resultados de las pruebas de genotoxicidad para cada animal evaluado.

Cuadro II. Resultados de la prueba de micronúcleos en los diferentes grupos de experimentación

Grupo	Animal	Células observadas	Células con micronúcleos	Porcentaje de células micronucleadas
A (Extracto de semilla de Aguacate)	A1	1000	20	2.0
	A2	1000	12	1.2
	A3	1000	20	2.0
	A4	1000	11	1.1
	A5	1000	19	1.9
				$X \pm DE 1.64 \pm 0.45$
B (Control positivo, Colchicina)	B1	1000	172	17.2
	B2	1000	230	23.0
	B3	1000	216	21.6
	B4	1000	131	13.1
	B5	1000	174	17.4
				$X \pm DE 18.46 \pm 3.93$
C (Control negativo, Solvente)	C1	1000	11	1.1
	C2	1000	11	1.1
	C3	1000	10	1.0
	C4	1000	10	1.0
	C5	1000	11	1.1
				$X \pm DE 1.06 \pm 0.054$

X: Media

DE: Desviación Estándar

Los resultados de la prueba de genotoxicidad mostraron una clara evidencia del daño ocasionado por el control positivo utilizado (colchicina), así también se observó una pequeña cantidad de células micronucleadas tanto en el control negativo como en la muestra del extracto de semilla de aguacate.

De acuerdo a los estudios de cinética de inducción de micronúcleos (Vallarino y Morales, 2001) un punto crítico de la prueba es utilizar una dosis adecuada de la sustancia empleada como control positivo y realizar el muestreo entre treinta y cuarenta horas después de la dosificación.

Respecto a la técnica de tinción utilizada en este trabajo, la cual se basó en la aplicación del colorante naranja de acridina, cabe mencionar que proporciona una ventaja considerable al ayudar a diferenciar las células micronucleadas. Con otros colorantes como Giemsa, se requiere mayor habilidad para identificar los micronúcleos. Actualmente las recomendaciones de los grupos de investigación que trabajan con la técnica de micronúcleos, sugieren la utilización de colorantes específicos del DNA como el naranja de acridina (Asano et al, 1998; Hayashi et al, 2000).

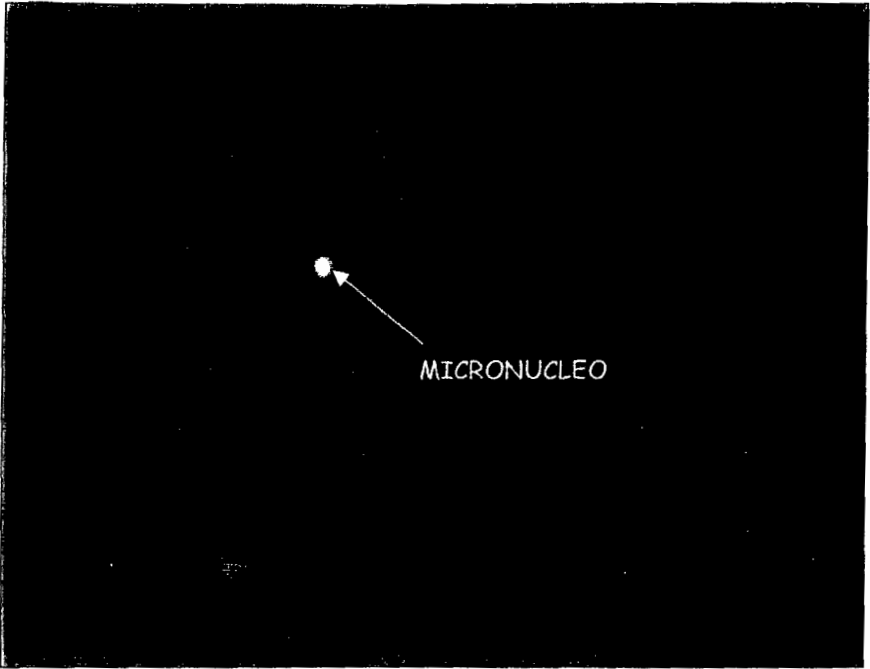


Figura 9. Eritrocitos teñidos con naranja de acridina (Obsérvese la célula micronucleada).



Figura 10. Eritrocitos teñidos con naranja de acridina.

8.3. Análisis estadístico.

Los valores promedio de cada grupo experimental se sometieron a un análisis estadístico para determinar la significación estadística.

Cuadro III. Resultados de la prueba estadística (t de student).

Grupos analizados	Valor de t calculado	Valor de t tabulado	Decisión
Control negativo y extracto	2.857	2.896	Diferencia <u>no</u> significativa
Control negativo y control positivo	10.109	2.896	Diferencia significativa
Control positivo y extracto	9.498	2.896	Diferencia significativa

Los resultados del análisis estadístico mostraron que el valor de t tabulado es mayor al valor de t calculado, lo cual significa que no existen diferencias estadísticamente significativas entre el control negativo y el grupo al que se le administro el extracto de semilla de aguacate. Por lo tanto, se considera que el extracto de semilla de aguacate no muestra actividad genotóxica con la prueba de micronúcleos.

La ausencia de genotoxicidad es un parámetro importante para el caso de extractos naturales que pretendan emplearse como aditivos en los alimentos. Es importante señalar que los extractos naturales no implican por si mismos que carecen de efectos nocivos en la salud humana, como serian los efectos genotóxicos.

La ausencia de genotoxicidad en estudios realizados a extractos vegetales, con aplicaciones en la industria farmacéutica o de los alimentos, queda de manifiesto en varios reportes; como los realizados en una planta utilizada en la medicina oriental "bojungchisuptang" (Ryu et al, 1998). Asimismo, los estudios realizados en extractos de plantas de México; *Senna wislizeni* y *Senna skinneri* (Baez, et al. 2002).

En el caso del estudio que se realizó a las tinturas de *Melissa officinalis* L. (toronjil) y *Mentha piperita* L. (toronjil de menta), mediante la prueba de micro núcleos y segregación mitótica, en medula ósea de ratón y un hongo diploide respectivamente, no se encontró daño citotóxico significativo, ni la ocurrencia de efectos genotóxicos (Vizoso et al, 1997).

Los datos acerca de la genotoxicidad de los extractos naturales son variados, ya que algunos reportes indican daños genéticos ocasionados por extractos vegetales, aún en aquellos que se han utilizado en la medicina herbolaria. Lo cual refuerza la necesidad de conocer el perfil toxicológico de aquellas

sustancias que están o podrían a estar en contacto directo con los seres humanos.

Prueba de esto son los estudios realizados en Israel con aceite de aguacate en ratas, donde se concluyó que el consumo de dicho aceite puede causar cambios negativos en el metabolismo hepático (Werman *et al*, 1989).

En otro estudio donde se evaluó la genotoxicidad de la capsaicina, mediante la prueba de inducción de micronúcleos de sangre periférica humana se obtuvo como resultado una respuesta genotóxica por parte de este extracto natural (Marques *et al*, 2002).

Otra evidencia de la genotoxicidad de extractos de origen natural se presenta en el trabajo realizado para la determinación de micro núcleos en células de la medula ósea de roedores con un extracto de la planta medicinal *Hibiscus elatus* Sw (Montero *et al*, 2001).

Cabe mencionar que en la revisión bibliográfica realizada para este trabajo, no se encontraron estudios acerca de la genotoxicidad de extractos de semilla de aguacate. Sin embargo, tomando en consideración los componentes químicos del extracto en cuestión, se encontró la referencia de algunos compuestos flavonoides, como la quercetina, a los cuales se les atribuye la capacidad de promover el desarrollo de tumores (Sone *et al*, 1999).

Los componentes reportados para el extracto de semilla de aguacate son compuestos polifenólicos como los flavonoides, los cuales muestran un carácter dual con respecto a sus efectos farmacológicos y su toxicidad potencial ya que se ha reportado capacidad antígenotóxica del flavonoide galangina, por su capacidad antioxidante, inclusive se sugiere emplearlo en la quimioprevención del cáncer (Heo y Sohn, 2001).

Otros extractos naturales con indicios de actividad antígenotóxica son los carotenoides, como inhibidores de la mutagenicidad inducida por agentes oxidantes (González de Mejía *et al*, 1997).

Las diferentes actividades biológicas de los compuestos polifenólicos y en general de los extractos naturales puede explicarse en función de las concentraciones utilizadas ya que compuestos con efectos benéficos pueden provocar alteraciones toxicológicas en concentraciones superiores.

A fin de proteger la salud de la población, es importante establecer márgenes de seguridad, como el valor denominado IDA (ingesta diaria admisible), que garanticen la seguridad en la utilización de productos de consumo humano, para lo cual es imprescindible la evaluación de daños celulares y genéticos.

En este trabajo se utilizó solamente el enfoque de la evaluación genotóxica. Sin embargo, cabe recalcar la necesidad de los estudios integrales que permitan abarcar los posibles efectos negativos por la exposición a las sustancias de los alimentos.

En el caso específico de los daños a nivel genético, es recomendable proseguir la evaluación con diferentes métodos de prueba como el Test de Ames en bacterias y la utilización de líneas celulares humanas, con la finalidad de cumplir con las reglamentaciones internacionales que establecen la evaluación genotóxica con una batería de pruebas *in vitro* e *in vivo* (Kirkland, 2000).

Asimismo, es necesario abordar otros tipos de daños posibles, como los relacionados con el sistema inmunológico y aquellos que modifican la función endocrina, en este sentido, se ha reportado un incremento en el nivel de metabolitos estrogénicos por parte de algunos flavonoides (Sone *et al*, 1999).

9. CONCLUSIONES

Es necesaria la evaluación de los riesgos de afectación humana de todas aquellas sustancias que vayan a destinarse al consumo de las personas.

La prueba de micronúcleos es una técnica sencilla y de bajo costo que permite la evaluación de sustancias que pudieran ocasionar daños en el material genético. Dichos daños podrían estar involucrados en el origen del cáncer.

Este estudio contribuye al conocimiento y estimación del riesgo-beneficio que puede derivarse del uso de estos vegetales como aditivos alimenticios.

El extracto de la semilla de aguacate no es genotóxico, lo cual permite continuar su desarrollo como antioxidante.

10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Asano, N., Y. Katsuma, H. Tamura, N. Higashikuni. 1998. An automated new technique for scoring the rodent micronucleus assay: computerized image analysis of acridine orange supravivally stained peripheral blood cells. *Mutat Res.* 404:149-154.

Alia, M., E. Laborda y A. Antón. 1992. Mutagenicity-Carcinogenicity as Related to Teratogenic Activity. *Bull Environ Contam Toxicol.* 48:275-281.

Argueta, A., L. Cano y M. Rodarte. 1994. Atlas de las plantas de la medicina tradicional mexicana Vol. I. Instituto Nacional Indigenista. 1era. Edición. México.

Atzin, J. 1990. Antiguo recetario medicinal azteca. 4a edición. Gómez-Gómez Hnos. editores.

Baez, D., G. Zepeda, P. Cano y M. Breña. 2002. Use of the SOS-chromotest spot assay as a screening system for detecting genotoxic compounds in crude plant extracts. *Atla-Alternatives to Laboratory Animals.* 30 (1):87-92.

Barrientos, A.F., E. García y E. Avitia. 1996. Anatomía del fruto de Aguacate, ¿Drupa o Baya?. *Revista Chapingo, serie horticultura* 2: 189-198.

Cabrera, L. 1996. Tratado de plantas curativas de México. Editores Mexicanos Unidos.

Comunidad Económica. 1992. Directiva 92/69/CEE. Diario Oficial de las Comunidades Europeas.

De Luna, J.M. y C.A. Flores. 1994. Sistema producto Aguacate. Chapingo. México.

De Smet P. 1995. Should herbal medicine-like products be licensed as medicines? *BMJ*. 310:1023.

Días B., E. Madrigal, L. Medina, N. Colunga. 1996. Estudio del efecto clastogénico de un extracto de pimienta negra en células de sangre periférica de ratones tratados durante seis semanas. *Memorias del Primer Congreso Nacional de Plantas Medicinales de México*. Tlaxcala.

Edzard, E. 1998. Harmless Herbs?: A review of the recent literature. *Am J Med*. 104 (2):170-178).

FDA. 1999. Preparation of premarket notifications for food contact substances: Toxicology recommendations. Center for Food Safety and Applied Nutrition. USA.

FDA. 2000. Mammalian erythrocyte micronucleus test. *Toxicological Principles for the Safety of Food Ingredients*. Redbook 2000.

Gallo, M., M. Gochfeld y B.D. Goldstein. 1987. Biomedical Aspects of the Environmental Toxicology. En: Lave, L.B. y A.C. Upton (Eds.). *Toxic Chemicals, Health, and the Environment*. The Johns Hopkins University Press, Baltimore. pp. 170-204

Gardner, E. y D. P. Snustad. 1984. *Principles of genetics*. John Wiley & Sons. New York.

González de Mejía E., G. Loarca Piña y M. Ramos Gomez. 1997. Antimutagenicity of xanthophylls present in Aztec Marigold (*Tagetes erecta*) against 1-nitropyrene. *Mutat Res*. 389 (2-3):219-26.

Hayashi, M., J. MacGregor, D. Gatehouse, D. Blakey, S. Dertinger. 2000. In vivo rodent erythrocyte micronucleus assay. II. Some aspects of protocol design including repeated treatments, integration with toxicity testing and automated scoring. *Environ Mol Mutagen.* 35:234-252.

Hernández, Á.M. y A. Prieto. 1999. Plantas que contienen polifenoles. Antioxidantes dentro del estilo de vida. *Rev Cubana Invest Biomed.* 18(1):12-4

Hernández, M.R. y J.M. Gally. 1981. Plantas medicinales. Editorial Arbol.

Heo, M. y S. Sohn. 2001. Anti-genotoxicity of galangin as a cancer chemopreventive agent candidate. *Mutat Res.* 488 (2):135-150.

Hoffmann, R.G. 1994. Genetic Toxicology. En: Amdur, O., J. Doull y C. Klaassen (Eds.) *Casarett and Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons.* Pergamon Press, New York.

INEGI. 1994. VII Censo Agropecuario de 1991. Análisis de la situación frutícola en México.

Kirkland, D., M. Hayashi, J. MacGregor, L. Müller. 2000. Summary of major conclusions from the international workshop on genotoxicity test procedures. *Environ Mol Mutagen.* 35:162-166.

Kirsch-Volders, M., T. Sofuni, M. Aardema, S. Albertini. 2000. Report from the In Vitro micronucleus assay working group. *Environ Mol Mutagen.* 35:167-172.

Lin J.L. y Y.S. Ho. 1994. Flavonoid-induced acute nephropathy. *Am J Kidney Dis.* 23:433-440.

Lu, F.C. 1991. Mutagenesis. en: Basic Toxicology: Fundamentals, Target Organs, and Risk Assessment. Hemisphere. Washington. pp. 117-130.

McCarthy, J.F. y L.R. Shugart. 1990. Biomarkers of Environmental Contamination. Lewis Publishers (Ed.). Boca Raton, Florida.

Marques, S., N. Oliveira, T. Chaveca, J. Rueff. 2002. Micronuclei and sister chromatid exchanges induced by capsaicin in human lymphocytes. *Mutat Res.* 517(1-2); 39-46.

Mendelsohn M. y R. Albertini. 1990. Mutation and the environment Part C: Somatic and heritable mutation, adduction, and epidemiology.

Montero, R., P. Arnáez, F. Esperón, B. Barro. 2001. Estudio genotóxico in vivo de 6 extractos de plantas medicinales en células de la médula ósea de roedores. *Rev Toxicol.* 18: 75-78.

Ochse J., M. Soule, M. Dijkman, C. Wehlburg. 1986. Cultivo y mejoramiento de plantas tropicales y subtropicales. Editorial Limusa. México.

Perharic L., D. Shaw, M. Colbridge. 1994. Toxicological problems resulting from exposure to traditional remedies and food supplements. *Drug Safety.* 11:284-294.

Ramos-Godinez, R. 1999. Estudio comparativo de la obtención de oleoresina de semilla de Aguacate (C.V. Hass) por diferentes técnicas extractivas. Tesis Maestría en proceso biotecnológicos. Universidad de Guadalajara.

Rodríguez, R. A. 1997. Las toxinas ambientales y sus efectos genéticos. Número 124 de la serie: La ciencia para todos. Fondo de Cultura Económica. México.

Ryu, J., K. Kim, H. Kim, J. Youn. 1998. Genotoxicity study of bojungchisup-tang, an oriental herbal decotion in vitro chromosome aberration assay in Chinese hamster lung cells and in vivo supravital-staining micronucleus assay with mouse peripheral reticulocytes. *Archives of Pharmacological Research*. 21 (4): 391-397.

SAGAR. 1996. *El Aguacate Mexicano*. Michoacan. México.

Sone, H., C. Tohyama y J. Yonemoto. 1999. Risk assessment of the flavonoids, quercetin as an endocrine modifier. *Journal of Risk Research*. 2 (2):151-166.

Surh Y. y S. Lee. 1996. Capsaicin in hot chilli pepper: carcinogen, cocarcinogen or anticarcinogen. *Feed Chem Toxicol*. 34:313-316.

Valencia, C. 1995. *Fundamentos de Fitoquímica*. 1era. Edición. Editorial Trillas, México.

Vallarino-Kelly, T. Y P. Morales-Ramírez. 2001. Kinetics of micronucleus induction and citotoxic activity of colchicine in murine erytoblast in vivo. *Mutat Res*. 495:51-59.

Varanda, E., G. Pozetti, M. Lourenco, W. Vilegas. 2002. Genotoxicity of *Brosimum gaudichaudii* measured by the Salmonella/microsome assay and chromosomal aberrations in CHO cells. *Journal of Ethnopharmacology*. 81 (2): 257-264.

Vargas, V.M., R. Guidobono y J. A. Henriques. 1991. Genotoxicity of plant extracts. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 86 (Suppl 2):67-70.

Venitt, S. y J. M. Parry. 1984. *Mutagenicity testing*. IRL Press. Oxford.

Vet. J. R. 1994. Putative Avocado Toxicity in two Dogs. Department of Clinical Studies, University of Nairobi, Kenya.

Vizoso, P., A. Ramos, A. Villaescusa, M. Decalo. 1997. Estudio genotóxico *in vitro e in vivo* en tinturas de *Melissa officinalis* L. (toronjil) Y *Mentha piperita* L. (toronjil de menta). Rev Cubana de Plant Med. 2(1): 6-11.

Wakata, A., Y. Miyamae, S. Sato, T. Suzuki, T. Morita. 1998. Evaluation of the rat micronucleus test with bone marrow and peripheral blood: Summary of the 9th collaborative study by CSGMT/JEMSMMS. Environ Mol Mutagen. 32:84-100.

Werman, M. y I. Neeman. 1986. Effectiveness of antioxidants in refined, bleached Avocado oil. Journal of Analyses Oil Chemist's Society. 63:352-355.

Werman, M., S. Mokady, I. Neeman, L. Auslaender, A. Zeidler. 1989. The effect of avocado oils on some liver characteristics in growing rats. Food Chem Toxicol. 27(5): 279-282.

SOY EL VIENTO

*En una palabra yo soy el cielo
Soy eterno y nunca muero
Soy testigo del nacimiento del tiempo
Soy inocente, incluso sublime cuando quiero
Estoy en todas partes y en ningún lugar
Nadie me acompaña
Soy incontrolable, violento y traigo serenidad*

*Soy el este y soy el oeste
Traigo la paz y la inquietud
Soy la vida sobre el mar y elegante por satisfacción
Soy constante y traigo el cambio
Soy familiar e incluso extraño
Dentro de ti me puedes sentir
Y mientras estas callado yo hablo para que me puedas oír*

*Soy aliado de la noche y cómplice del mar
Aunque corras con todas tus fuerzas
No me puedes alcanzar*



Escrito por:
Mark Reynolds y Chris Reynolds