



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ**

**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS**

**CARACTERIZACIÓN DE LA LOCOMOCIÓN DE RATAS  
EXPUESTAS A SEMILLAS DE *Dioon edule* Lindl.**

**Tesis que para obtener el título de:  
Químico Farmacobiólogo**

**Presenta:**

**ALEJANDRA COVARRUBIAS CAMARILLO**

**Asesorado por:**

**Dra. Erika García Chávez  
Profesora-Investigadora del IIZD-UASLP**

**Coasesora:**

**Dra. Norma Cecilia Cárdenas Ortega  
Profesora de Farmacognosia de la FCQ-UASLP**

**San Luís Potosí, S.L.P.**

**Diciembre de 2009**





## APROBACION DE TEMA DE TESIS

**SRITA. ALEJANDRA COVARRUBIAS CAMARILLO**  
**PRESENTE:**

Por este conducto me permito informar a USTED que el H. Consejo Técnico Consultivo de esta Facultad de Ciencias Químicas, en sesión ordinaria de fecha 24 DE MARZO DEL 2009, tuvo a bien aprobar el tema de su tesis profesional titulada: "CARACTERIZACIÓN DE LA LOCOMOCIÓN DE RATAS EXPUESTAS A SEMILLAS DE *Dioon edule* Lindl.", mismo que será asesorado por DRA. ERIKA GARCÍA CHÁVEZ y coasesorada por la DRA. NORMA CECILIA CÁRDENAS ORTEGA, para la presentación de su examen profesional de **Químico Farmacobiólogo**.

Sin más por el momento queda de usted.

*Atentamente*

  
\_\_\_\_\_  
**ING. ROGELIO A. COLUNGA REYNA**  
**SECRETARIO DE LA FACULTAD**



**CIENCIAS QUÍMICAS**  
**SECRETARÍA**

San Luis Potosí, S.L.P., 26 de marzo del 2009.

Este trabajo se realizó en el Instituto de Investigación de Zonas Desérticas (IIZD) y el Laboratorio de Farmacognosia de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí, con apoyo financiero del Programa de Mejoramiento del Profesorado (PROMEP/103.5/08/5625 folio UASLP-PTC-151), bajo el proyecto Exploración etnobotánica y evaluación farmacológica de plantas con efecto anti-inflamatorio de la Sierra Madre Oriental de San Luis Potosí, así como de The Society Cycads bajo el proyecto Chamal (*Dioon edule* Lindl.) in the state of San Luis Potosí, México.

Bajo la dirección de la Dra. Erika García Chávez (IIZD-UASLP) y Coasesoría de los doctores: Dra. Norma Cecilia Cárdenas Ortega (FCQ-UASLP), Dra. Laura Yáñez Espinosa (IIZD-UASLP) y Dr. Ismael Jiménez Estrada (Dep. Fisiología, Neurociencias y Biofísica-CINVESTAV-Zacatenco).

## **Dedicatoria**

**Esta tesis la dedico enteramente a Dios,  
a mi familia  
y a todos aquellos que estuvieron a mi lado  
en esta etapa de vida.**

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Universidad Autónoma de San Luis Potosí, en especial a la Facultad de Ciencias Químicas por brindarme los conocimientos para mi desarrollo profesional.

Al Instituto de Investigación de Zonas Desérticas, en especial a la Doctora Erika García Chávez por darme la oportunidad de trabajar en este proyecto bajo su dirección, así como por confiar en mí, por su apoyo, comprensión y amistad.

A la Dra. Norma Cecilia Cárdenas Ortega, por su asesoría en la realización del análisis fitoquímico preliminar, por su apoyo y recomendaciones.

A la Dra. Laura Yáñez Espinosa por confiar en mí para trabajar en este proyecto, por sus consejos, recomendaciones y apoyo.

Al Dr. Ismael Jiménez Estrada por su apoyo en la realización del análisis de locomoción.

Al Dr. J. Rogelio Aguirre R., director del Instituto de Investigación de Zonas Desérticas por su interés en el proyecto.

Al Dr. Gerson Alonso Soto Peña por su apoyo durante el trabajo experimental, sus aportaciones y recomendaciones.

A la Dra. Bertha I. Juárez F. por su interés, consejos y recomendaciones durante el desarrollo del proyecto.

A Marilú por sus consejos, apoyo y alegría, así como a todas aquellas personas del Instituto de Investigación de Zonas Desérticas con las que conviví.

A Paola Rodríguez y Paulina Guzmán por compartir experiencias, locuras, consejos y sobre todo por su apoyo para seguir en esto.

A la banda de amigos de la generación, por su apoyo y alegría.

A todas aquellas personas que estuvieron conmigo y me dieron ánimos.

A PROMEP por la beca recibida a través del proyecto UASLP-PTC-151.

## RESUMEN

Las cícadas son un pequeño grupo de gimnospermas dioicas tropicales y subtropicales, clasificadas en tres familias (Cycadaceae, Stangeriaceae y Zamiaceae) y 11 géneros. Sus principales usos son: ornamental, alimentario, medicinal e insecticida, entre otros. Dentro del uso alimentario, se ha identificado que las semillas de *Cycas micronesica* Hill, poseen un alto grado de toxicidad asociada al contenido de un aminoácido no proteico conocido como  $\beta$ -N-metilamino-L-alanina (L-BMAA). Estudios en animales han demostrado alteraciones del comportamiento, rigidez en las extremidades, movimientos involuntarios, dificultad en su locomoción e incluso la muerte. En humanos causa una enfermedad neurológica conocida como esclerosis lateral amiotrófica-demencia compleja parkinsoniana (ALS-PDC).

*Dioon edule* Lindl. (Chamal), se distribuye en San Luis Potosí, particularmente en la región Huasteca localizada en la Sierra Madre Oriental, en la comunidad conocida como La Palma, perteneciente al municipio de Rayón. Un estudio etnobotánico reciente, señala la presencia de toxicidad en animales de corral por el consumo de semillas, caracterizada por: diarrea, parálisis de las patas traseras, dificultad para caminar y en algunos casos la muerte. En humanos se describen alteraciones gastrointestinales y motoras tras el consumo de alimentos preparados con semillas de Chamal (tamales). Acorde con estos antecedentes y la falta de evidencia científica sobre los efectos tóxicos de la especie *Dioon edule* Lindl., consideramos importante caracterizar *in vivo* los efectos sobre la locomoción (dificultad para caminar), como principal signo de toxicidad observado en animales y humanos. Además, evaluar si existe una posible correlación tóxica sobre la locomoción entre el género *Dioon* y el género *Cycas* por pertenecer al mismo orden. Asimismo, realizar un estudio fitoquímico preliminar, para conocer los posibles compuestos responsables de tales efectos.

Las semillas y los componentes individuales (sarcotesta y gametofito) de *Dioon edule* Lindl., a dosis de 0.5 g/kg, mostraron efectos sobre la locomoción no restringida y en campo abierto. Tal alteración se asocia a la presencia de metabolitos secundarios como: alcaloides y aminoácidos libres, los cuales tienen una participación importante sobre la excitación e inhibición del sistema nervioso.

## ÍNDICE GENERAL

RESUMEN .....	I
ÍNDICE DE FIGURAS .....	VI
ÍNDICE DE CUADROS .....	VIII
INDICE DE ABREVIATURAS .....	IX
I. INTRODUCCIÓN .....	1
1.1 Locomoción .....	1
1.2 Estructuras neuronales responsables del movimiento .....	1
1.3 Eventos nerviosos que origina la locomoción en los vertebrados.....	2
1.4 Ciclo del aparato locomotor .....	3
1.5 Cinemática .....	5
1.6 Actividad espontánea en campo abierto .....	6
II. ANTECEDENTES .....	7
2.1 Las cicadales .....	7
2.1.1 Clasificación de las cicadales .....	7
2.1.2 Usos tradicionales de las cicadales .....	8
2.1.3 Toxicidad de las cicadales .....	8
2.1.4 Evaluación toxicológica del L-BMAA .....	10
2.2 <i>Dioon edule</i> Lindl. (Zamiaceae) .....	11
2.2.1 Distribución geográfica y ecológica de <i>Dioon edule</i> Lindl.....	11
2.2.2 Descripción botánica .....	12
2.2.3 Usos tradicionales .....	13
2.3 Justificación .....	13
2.4 Hipótesis .....	14
2.5 Objetivo general .....	14
2.6 Objetivos específicos .....	14
III. MATERIALES Y MÉTODOS .....	16
3.1 Estudio fitoquímico preliminar de la semilla y sus componentes individuales (sarcotesta y gametofito) de <i>Dioon edule</i> Lindl.....	16

3.1.1	Recolección del material vegetal .....	16
3.1.2	Preparación del material vegetal .....	16
3.1.3	Preparación de los extractos .....	16
3.1.4	Análisis fitoquímico cualitativo de los extractos .....	17
3.2	Evaluación del efecto tóxico sobre la alimentación y ganancia de peso de las ratas expuestas a dosis diferentes de semilla de <i>Dioon edule</i> Lindl.....	18
3.2.1	Modelo animal .....	18
3.2.2	Tratamientos .....	18
3.2.3	Grupos experimentales .....	19
3.3	Evaluación del efecto sobre la locomoción (no restringida y campo abierto) de ratas expuestas a la semilla y sus componentes (sarcotesta y gametofito).....	19
3.3.1	Locomoción no restringida .....	19
3.3.2	Actividad espontánea en campo abierto .....	20
3.4	Análisis estadístico .....	20
IV.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	21
4.1	Estudio fitoquímico preliminar de la semilla y sus componentes individuales (sarcotesta y gametofito) de <i>Dioon edule</i> Lindl.....	21
4.2	Evaluación del efecto tóxico sobre la alimentación y ganancia de peso de las ratas expuestas a semillas de <i>Dioon edule</i> Lindl.....	23
4.3	Evaluación del efecto tóxico sobre la alimentación y ganancia de peso de las ratas expuestas a semillas y sus componente individuales (sarcotesta y gametofito) de <i>Dioon edule</i> Lindl.....	26
4.4	Evaluación del efecto sobre la locomoción (no restringida y campo abierto) de ratas expuestas a la semilla y sus componentes (sarcotesta y gametofito).....	30
4.4.1	Análisis locomoción no restringida .....	30
4.4.2	Análisis en campo abierto .....	36
V.	CONCLUSIONES .....	41
VI.	PERSPECTIVAS .....	42

VII.	ANEXO 1.	Pruebas para el análisis fitoquímico .....	43
VIII.	ANEXO 2.	Glosario de términos botánicos .....	57
IX.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....		58

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	1. Ciclo de paso .....	4
Figura	2. Flexión de las articulaciones .....	4
Figura	3. Diagrama de la cinemática de la locomoción .....	5
Figura	4. Clasificación de las cicadales actuales .....	8
Figura	5. Toxinas de las cicadales .....	9
Figura	6. Estructuras reproductoras de <i>Dioon edule</i> Lindl. ....	12
Figura	7. Desplazamiento de rata en pasarela .....	19
Figura	8. Efecto de las semillas de <i>Dioon edule</i> Lindl. en el consumo de alimento.....	24
Figura	9. Efecto de las semillas de <i>Dioon edule</i> Lindl. en el consumo de agua.....	24
Figura	10. Efecto de las semillas de <i>Dioon edule</i> Lindl. sobre la ganancia de peso.....	25
Figura	11. Efecto de <i>Dioon edule</i> Lindl. en el consumo de alimento.....	27
Figura	12. Efecto de <i>Dioon edule</i> Lindl. en el consumo de agua.....	29
Figura	13. Efecto de <i>Dioon edule</i> Lindl. sobre la ganancia de peso.....	29
Figura	14. Análisis de la flexión en la locomoción no restringida de la rata.....	31
Figura	15. Análisis de la extensión en la locomoción no restringida de la rata.....	31
Figura	16. Análisis de la fase de soporte en la locomoción no restringida de la rata.....	32
Figura	17. Análisis de la longitud de la zancada en la locomoción no restringida de la rata.....	33
Figura	18. Análisis de la duración de la zancada en la locomoción no restringida de la rata.....	33

Figura	19. Análisis de la velocidad de la zancada en la locomoción no restringida de la rata.....	34
Figura	20. Diagrama del desplazamiento de las ratas en campo abierto.....	37
Figura	21. Análisis de la distancia recorrida en la locomoción de la rata en campo abierto.....	37
Figura	22. Velocidad promedio de desplazamiento de la rata en campo abierto.....	38

## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro	1. Resultados del análisis fitoquímico preliminar de <i>Dioon edule</i> Lindl.....	22
--------	--	----

## ÍNDICE DE ABREVIATURAS

- Cb.** Clima templado con verano fresco y largo. Temperatura media anual 12.1°C, temperaturas medias mensuales 9.8°C.
- Af.** Clima de selva tropical lluvioso. Temperaturas altas todo el año (el mes más frío por encima de 18°C; precipitaciones intensas durante los doce meses del año, sin una estación seca definida.
- Am.** Clima monzónico. Es un clima muy lluvioso, en torno a los 2,500 mm, y con escasa oscilación térmica, entre 25 y 27°C.
- Aw.** Clima tropical de sabana. Temperaturas altas todo el año; el mes más frío, por encima de 18°C.
- Bsh.** Clima semiárido, verano seco y caluroso con temperaturas medias superiores a los 25°C y máximas suaves en la costa y muy altas en zonas interiores, pudiendo sobrepasar los 45°C en situaciones de olas de calor

## I. INTRODUCCIÓN

### 1.1 Locomoción

La locomoción es una serie de movimientos rítmicos o cíclicos, controlados por una red central, generadora de patrones de movimiento, localizada al interior y a lo largo de la columna vertebral, que a su vez está bajo la influencia de señales periféricas ascendentes (aférentes sensoriales) y descendentes (eferentes motoras), ampliamente coordinadas por el Sistema Nervioso (Grillner, 1981).

El sistema nervioso central comprende el encéfalo (cerebro, cerebelo y tronco encefálico) y la médula espinal. Estos órganos correlacionan la información sensorial que llega a ellos, a través de impulsos nerviosos generados por los nervios periféricos sensoriales, los cuales son estimulados por las sensaciones de dolor, vibración y temperatura. Una vez codificada la información, esta es transmitida por vías eferentes a través de los nervios motores que conectan al encéfalo y la médula espinal con las glándulas y los músculos (Purves, *et al.*, 2001; Tortora, *et al.*, 2002).

### 1.2 Estructuras neuronales responsables del movimiento

Los conjuntos neuronales responsables del control del movimiento lo constituyen 4 subsistemas:

- a) *Circuito de la médula espinal*; el cual se localiza en la materia gris de la médula espinal. Este incluye a las neuronas motoras primarias o alfa, las cuales envían sus axones fuera de la médula espinal para inervar fibras del músculo esquelético y las interneuronas medulares, que constituyen una fuente importante de las aferencias sinápticas a las neuronas motoras. Todas las órdenes para el movimiento, reflejo o voluntario, son transmitidas finalmente a los músculos por la actividad de las motoneuronas alfa, también

denominadas neuronas motoras inferiores, las cuales son la vía final común para la conducta motora.

- b) *Sistema descendente*; este subsistema motor consiste en neuronas cuyos cuerpos celulares se ubican en el tronco encefálico y la corteza cerebral. Los axones de las neuronas motoras superiores descienden para hacer sinapsis con interneuronas y/o neuronas motoras alfa. Los sistemas descendentes que se originan en el tronco encefálico, son responsables de integrar la información sensitiva vestibular, somatosensitiva y visual para ajustar la actividad refleja de la médula espinal y su contribución es fundamental para los movimientos básicos de dirección del cuerpo y el control de la postura.
- c) *Cerebelo*; su función principal es corregir los errores del movimiento, coordinando los componentes de los movimientos complejos.
- d) *Ganglios basales*; estos ejercen control sobre el movimiento mediante la regulación de la actividad de las neuronas motoras superiores que dan origen a las vías descendentes (Purves, *et al.*, 2001).

### **1.3 Eventos nerviosos que originan la locomoción en los vertebrados**

Gracias a los estudios de Grillner y colaboradores (1975), fue posible establecer la siguiente secuencia de eventos nerviosos que conducen a la generación de actividad locomotora en la mayoría de los vertebrados:

- a) Precediendo a la actividad locomotora, se produce un incremento en la actividad de las neuronas retículo-espinales del tallo cerebral del animal, lo que constituiría el comando u orden descendente para que se inicie la locomoción.

- b) La actividad supraespinal excita a todas las neuronas de los circuitos generadores de patrones locomotores en la médula espinal.
- c) Cada arreglo de interneuronas genera las secuencias rítmicas de excitación e inhibición de las motoneuronas, que controlan los músculos laterales o de las extremidades, según sea el caso.
- d) La alternancia en la actividad de los circuitos segmentales, ipsi y contralateral, surge por una acción inhibitoria recíproca entre tales circuitos, generando movimientos locomotores alternados, característicos de cada tipo de vertebrado.
- e) Los receptores periféricos de la piel y/o músculos, sensibles al estiramiento informan a los circuitos generadores espinales sobre la ejecución de cada uno de los movimientos, confiriendo al animal la capacidad de adaptarlos a las condiciones ambientales, propiciando así, un patrón motor repetido dentro de un ciclo del aparato locomotor (Jiménez, 1998; Van Emmerik, 1998; Purves, *et al.*, 2001; Büschges, 2005).

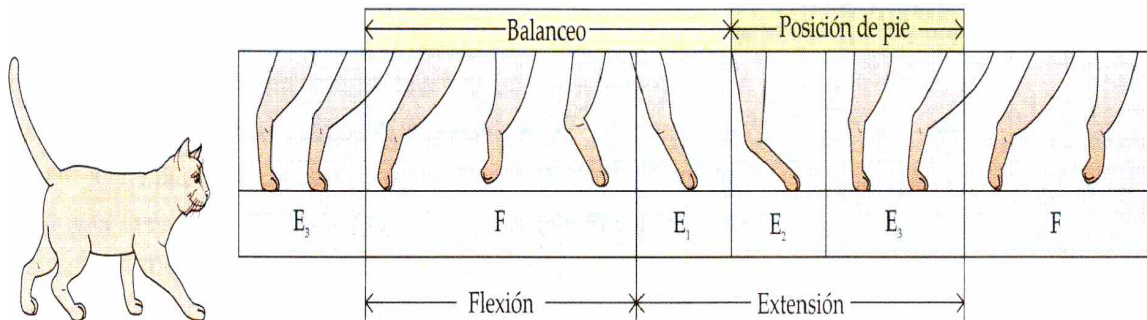
#### **1.4 Ciclo del aparato locomotor**

La locomoción se basa en secuencias de movimientos coordinados. Cuando un animal da un paso o zancada, cada una de las extremidades realiza una serie de movimientos básicos, los cuales se dividen en dos fases que conforman lo que se denomina un ciclo de paso.

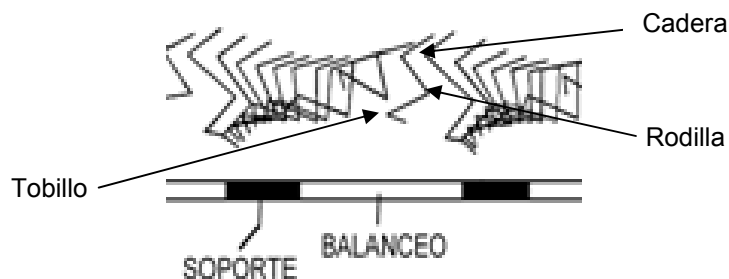
- a) *Fase de balanceo*. Durante esta fase, la pata del animal no se encuentra en contacto con el piso en ningún momento y comprende la flexión de la pata para separarla del suelo, el desplazamiento de la misma aún flexionada hacia delante y su extensión antes de tocar el piso ( $E_1$ ,  $E_2$  y  $E_3$  (Figura 1)). Al inicio de la fase de balanceo se flexionan las articulaciones de la cadera, de

la rodilla y del tobillo, mientras que al final se extienden las articulaciones de la rodilla y del tobillo, pero la de la cadera se mantiene flexionada (Figura 2).

- b) *Fase de soporte o de posición de pie.* En esta fase la pata del animal está en contacto continuo con el piso, en donde se desplaza en sentido contrario a la dirección que lleva el cuerpo y lo impulsa hacia delante (Figura 1). Durante la parte inicial de la fase de soporte, el animal extiende la articulación de la cadera y flexiona las articulaciones de la rodilla y del tobillo, para extenderlas en la parte final de esta fase (Figura 2) (Grillner, 1975; Jiménez, 1998).



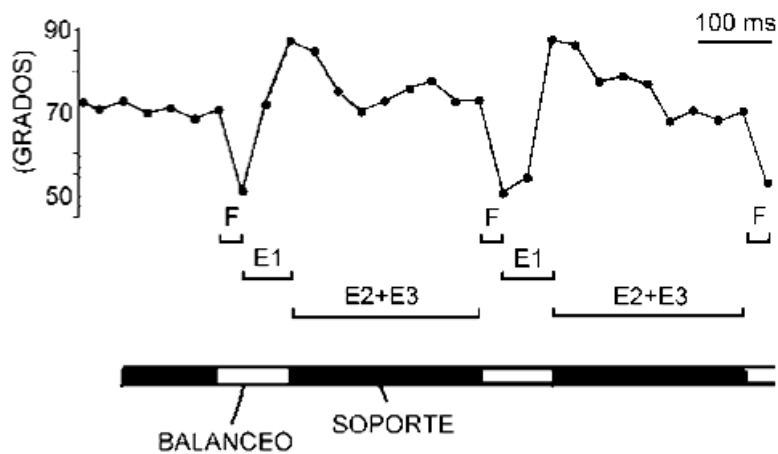
**Figura 1. Ciclo de paso.** Las fases que lo conforman son: la flexión (F) y la extensión (E<sub>1</sub>, E<sub>2</sub> y E<sub>3</sub>) de la pata, las cuales se relacionan con las fases de balanceo y la de posición de pie o soporte en la locomoción (Purves, *et al.*, 2001).



**Figura 2. Flexión de las articulaciones.** Cadera, rodilla y tobillo en las fases de soporte y balanceo (Jiménez, 1998).

## 1.5 Cinemática

La cinemática es la descripción geométrica de movimiento, en términos de desplazamientos, velocidades y aceleraciones. Los sistemas de cinemática son usados en el análisis de la locomoción, para registrar la posición y la orientación de los segmentos de cuerpo, los ángulos de las uniones y las velocidades lineales y angulares correspondientes, y aceleraciones (Figura 3).



**Figura 3. Diagrama de la cinemática de la locomoción.** Ángulos de las fases de la zancada: F= Flexión; E1= Extensión de las articulaciones en la base de balanceo; E2 + E3= Extensión de las articulaciones en la fase de soporte (García, 2006).

Las medidas cinemáticas simples permiten evaluar la alteración de la locomoción, para ello, su análisis no invasivo puede determinarse empleando un sistema de videograbación fijo, y un medio de calibración con interceptos de dimensiones conocidas detrás del sujeto (Whittle, *et al.*, 2003). El análisis cinemático de la locomoción (marcha), es de gran ayuda para caracterizar espacio-temporalmente las secuencias de movimientos que realizan las extremidades posteriores (o anteriores) durante la ejecución de la caminata, pero para llevar a cabo esto, se requiere que los animales no realicen algún tipo de conducta (por ejemplo: conducta de exploración o se distraigan), de tal forma que la marcha sea continua.

## **1.6 Actividad espontánea en campo abierto**

La medición de la actividad espontánea, permite identificar alteraciones en la función motora de un modelo animal, a través del análisis del desplazamiento y la coordinación de sus movimientos, así como el estado emocional del animal como la excitación o depresión (Evangelista, 1997). El procedimiento implica la confrontación del roedor con el medio ambiente. El animal se coloca en el centro o cerca de las paredes y el comportamiento se registra por un período de 15 min: locomoción horizontal (número de travesías de las líneas marcadas en el piso).

En tal situación, los roedores prefieren espontáneamente la periferia a la actividad en las partes centrales del campo abierto. De hecho, los ratones y las ratas caminan cerca de las paredes, un comportamiento llamado tigmotaxis. Un incremento del tiempo en la parte central de la caja es conocido como locomoción central/total o bien, un decremento de la fase de latencia en el centro de la caja es indicativo de anxiolisis (Evangelista, 1997; Jiménez, 1998; Prut y Belzung, 2003).

Es importante señalar que tanto el análisis cinemático de la marcha como el de la actividad espontánea en campo abierto son dos pruebas motoras que en esencia son totalmente diferentes (no son equivalentes entre sí), por lo que los resultados obtenidos deben ser interpretados de manera independiente. En el caso del análisis cinemático de la marcha, este método es de gran ayuda para caracterizar espacio-temporalmente las secuencias de movimientos que realizan las extremidades posteriores (o anteriores) durante la ejecución de una caminata normal, esto es, sin restricciones u obstáculos. Para llevar a cabo lo anterior, es imprescindible que los animales realicen las zancadas de la caminata de manera continua y a una velocidad estable (sin que se distraigan, realicen conductas exploratorias o que corran). En cambio, en el análisis de la actividad motora en campo abierto se incluyen todo tipo de conductas, tanto motoras (caminar, correr, pararse, etc.) como de exploración, aseo, dormir, etc.

## II. ANTECEDENTES

### 2.1 Las cicadales

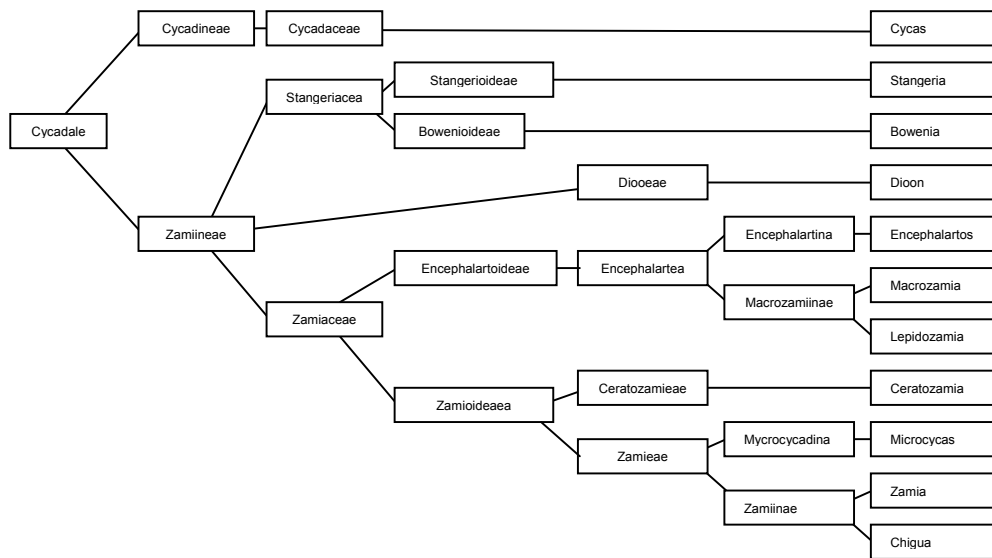
Las cicadales son un pequeño grupo de gimnospermas dioicas tropicales y subtropicales (Vovides, *et al.*, 2004). A menudo son llamadas "fósiles vivientes" porque formaban parte importante de la vegetación del planeta en la Era Mesozoica (300 millones de años) también llamada "Era de los dinosaurios y las cicadales" y porque su morfología se ha mantenido desde entonces (Vovides, 2000; Schneider, *et al.*, 2002; Brener, *et al.*, 2003a).

El nombre cícada se deriva de la palabra griega *koikas*, un nombre usado por Teofrasto para una palma egipcia, la Palma de Doum o árbol de jengibre (*Hyphanethe-baica*, *Arecaceae*); Linneo en el año 1737 fue el primero en nombrar uno de los géneros, el *Cycas* (Vovides, 2000; Yáñez, 2006).

Estas plantas se caracterizan por poseer tallos relativamente no ramificados, blandos y gruesos con muy poca madera desarrollada (manoxilemática), hojas grandes compuestas, y generalmente con estructuras reproductoras, conocidas como estróbilos (conos) grandes, terminales o subterminales, comúnmente de colores brillantes (Brener, *et al.*, 2003a). Las cicadales, pueden ser arborescentes, con troncos de más de 10 m de alto o plantas bajas con tallos subterráneos donde sólo se aprecian las hojas (Vovides, 2000).

#### 2.1.1 Clasificación de las cicadales

Las cicadales actuales se clasifican en tres familias (*Cycadaceae*, *Stangeriaceae* y *Zamiaceae*) y 11 géneros (Vovides, *et al.*, 2004; González, *et al.*, 2005; Yáñez, 2006). Existen 303 especies validas registradas, (Figura 4) (Vovides, *et al.*, 2004; Pérez, *et al.*, 2006).



**Figura 4. Clasificación de las cicadales actuales.** Filograma simplificado con base en el *rbcL* (Treutlein y Wink, 2002; Yáñez, 2006).

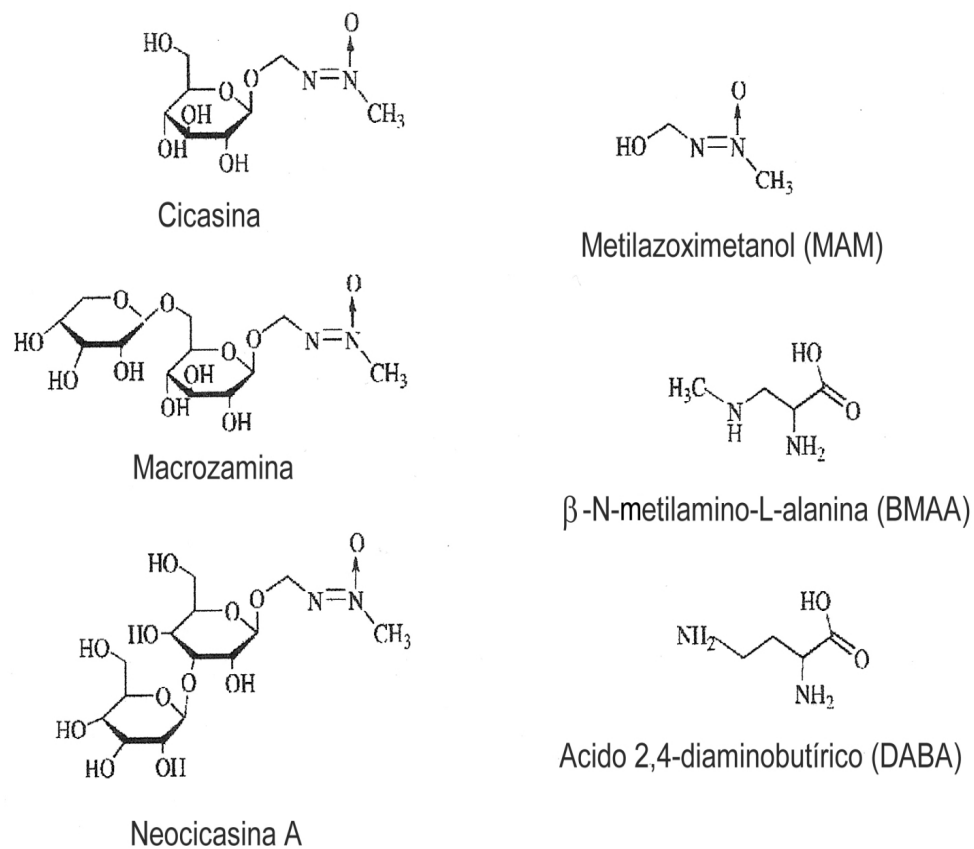
### 2.1.2 Usos tradicionales de las cicadales

Las cicadales poseen un significado religioso y cultural para diferentes pueblos alrededor del mundo. Según sus formas de uso se clasifican en: plantas ornamentales vivas, debido a que poseen hojas atractivas (compuestas) y conos masculinos gigantes (Brener, *et al.*, 2003a; Yagi, 2004); medicinales, insecticidas y comestibles. Actualmente estas plantas están en peligro de extinción (IUCN, 2009), debido a la destrucción de su hábitat y al comercio ilegal de plantas silvestres (CITES, 2003; Pérez, *et al.*, 2006).

### 2.1.3 Toxicidad de las cicadales

Como muchos otros grupos de plantas, las cicadales producen metabolitos secundarios y con frecuencia, los almacenan en altas concentraciones y en varios tejidos. Estos compuestos son secundarios, ya que no son vitales para el metabolismo de la planta, pero en muchos casos cumplen una función protectora por ser desagradables o tóxicos para los depredadores (Yáñez, 2006). Entre los

compuestos secundarios más importantes, se encuentran el metilazoxiglucósido cicasina, macrozamina y varias neocicasininas además de flavones diméricos (Figura 5). La toxina que se encuentra en menor concentración es el aminoácido no proteico, derivado de alanina,  $\beta$ -N-metilamino-L-alanina (L-BMAA), que en concentraciones elevadas es neurotóxico para mamíferos y aves (Schneider, *et al.*, 2002; Brener *et al.*, 2003a, Brener *et al.*, 2003b).



**Figura 5. Toxinas de las cicadales.** Metilazoxiglucósidos: cicasina, macrozamina, neocicacina A, metilazoximetanol (MAM); aminoácidos no proteicos:  $\beta$ -N-metilamino-L-alanina (L-BMAA), ácido 2,4-diaminobutírico (DABA) (Traducido de Schneider, *et al.*, 2002).

La especie *Cycas micronesica* Hill, distribuida ampliamente en la isla de Guam es considerada como una de las cicadales con una importante concentración de la neurotoxina L-BMAA en sus semillas. Trabajos recientes han demostrado que L-BMAA, es el responsable de la patología neurológica, conocida

como esclerosis lateral amiotrófica - demencia compleja parkinsoniana (ALS-PDC) que hace algunos años se presentaba con muy alta frecuencia (33%) entre los indios Chamorro de Guam (Brener, *et al.*, 2003a; Steward *et al.*, 2006; Yáñez, 2006; Pérez y Soto, 2007).

La ALS-PDC, se caracteriza por mostrar signos típicos de la inmovilidad post-encefálica y parálisis que semeja a la esclerosis lateral amiotrófica, en otros casos, se presenta una forma progresiva de la enfermedad de Parkinson (Spencer, 2003; Pérez y Soto, 2007).

La principal vía de intoxicación de la población con esta toxina, es a través de la dieta tras consumir los murciélagos zorros voladores (*Pteropus*), los cuales se alimentan de la sarcotesta de las semillas de esta especie (Banack y Cox, 2003; Cox, *et al.*, 2003; Murch, *et al.*, 2004; Ince y Codd, 2005).

#### **2.1.4 Evaluación toxicológica del L-BMAA**

Estudios realizados en monos alimentados con las semillas de *Cycas micronesica* Hill, han demostrado la presencia de una enfermedad aguda y reversible con daño en la médula espinal (parálisis flácida), en el núcleo estriado y en la corteza cerebral (que provoca parkinsonismo y cambios en la conducta) (Karamyan y Speth, 2008).

En ratas jóvenes, las inyecciones intraperitoneales de L-BMAA provocaron disfunción cerebral y degeneración de las células de Purkinje, de Golgi, estrelladas y en cesto del cerebelo (Pérez y Soto, 2007). Otros estudios en roedores expuestos a L-BMAA, señalan que a dosis orales de 0.1-0.3 g/kg/día presentan alteraciones del comportamiento, rigidez, movimientos involuntarios, dificultad en su locomoción e incluso la muerte (Karamyan y Speth, 2008).

## **2.2 *Dioon edule* Lindl. (Zamiaceae)**

De acuerdo con la lista mundial de cicadales (Hill, *et al.*, 2007) en México se distribuye la familia Zamiaceae, clasificada en los géneros *Dioon*, con 13 especies, *Zamia*, 15 especies y *Ceratozamia* con 20 especies. Este hecho coloca a México en el segundo lugar mundial en riqueza de especies de cicadales, (después de Australia), con aproximadamente 20% del total de las especies distribuidas en el mundo y de estas, el 80% son endémicas (Vovides 2000; Yáñez, 2006).

*Dioon edule* es considerada como la planta viviente más antigua de México, debido a que algunos ejemplares localizados en Jalapa, Veracruz tienen más de 2500 años de edad (Vovides y Peters, 1987). La adaptación de esta planta a los cambios ambientales que han transcurrido a través del tiempo geológico, se deben a su capacidad de modificar su sistema fotosintético llamado metabolismo ácido de las crasuláceas (Vovides, *et al.*, 1983; Vovides y Peters, 1987; González, *et al.*, 2003).

Los nombres comunes de *Dioon edule* Lindl., son: palma de dolores, palmita, palma de serrucho, palma de teresita, chamal, quiotamal, sotol, tullidora, tiotamal (Vovides, *et al.*, 1983; Yáñez, 2006).

### **2.2.1 Distribución geográfica y ecológica de *Dioon edule* Lindl.**

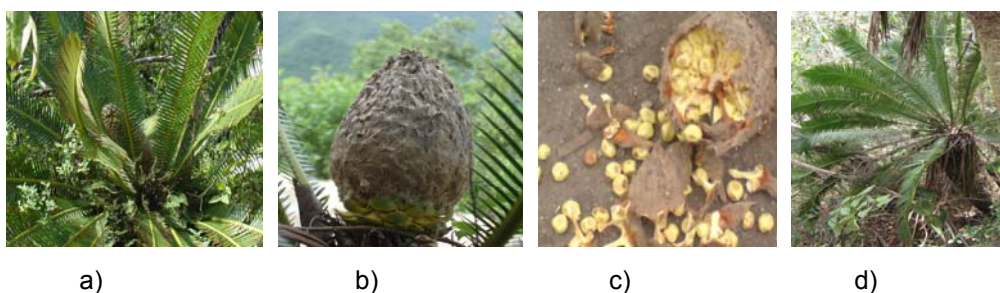
En nuestro país, estas plantas se distribuyen en el noreste de México, en los estados de Veracruz, Nuevo León, Tamaulipas, Querétaro, Guanajuato, Hidalgo y San Luis Potosí, particularmente en la región Huasteca localizada en la Sierra Madre Oriental, en la comunidad conocida como La Palma (21° 47'N; 99° 28'W). (Vovides, *et al.*, 1983; Vovides, 1990).

Respecto a la distribución ecológica, *Dioon edule* se encuentra a una altitud de 0-1600 m; Clima: Cb, Af, Am, Aw, BSh. Tipo de vegetación: matorral xerófilo,

vegetación de dunas costeras, bosque tropical subcaducifolio, bosque tropical caducifolio, bosque espinoso, bosque de *Pinus* y *Quercus* (Yáñez, 2006).

### 2.2.2 Descripción botánica

*Dioon edule* Lindl., es una planta arborescente; en forma de palma, hasta de 4 m de alto, 30-50 cm diámetro; 50-150 hojas de una corona. Hojas verde pálido o brillante o azul-verdes, semilustrosas a opacas, 100-200 cm largo, planas, con 70-150 folíolos; folíolos basales reducidos a espinas, pecíolo inerme por 5 cm; folíolos angostamente lanceolados, insertos en el raquis en ángulo recto; 6-12 cm de largo, 5-10mm de ancho; catafilos 20-30 mm de largo, tomentosos. Conos masculinos ovalados a fusiformes, pardo pálido, 15-40 cm de largo, 6-10 cm diámetro; ápice del microsporofilo 30 mm de largo, 20 mm de ancho. Conos femeninos ovados, gris pálido, 20-35 cm de largo, 12-20 cm de diámetro; ápice del megasporofilo 35 mm de largo, 25 mm de ancho. Semillas ovadas, 25-45mm de largo, 20-30mm de ancho, sarcotesta amarillo pálido o blanco (Figura 6) (Vovides, *et al.*, 1983; Yáñez, 2006).



**Figura 6. Estructuras reproductoras de *Dioon edule* Lindl.** a) Cono masculino; b) Cono femenino; c) Semillas en cono; d) Planta adulta de *Dioon edule* Lindl. Fotografía: Erika García Ch. y Laura Yáñez E.

### 2.2.3 Usos tradicionales

A través de la historia, *Dioon edule* ha sido usada de diversas maneras por el hombre. Siendo más extensivo como planta ornamental. Las frondas se utilizan en pequeña escala como adorno en las iglesias en festividades religiosas, la testa vacía de las semillas es usada como juguete por los niños, ya que emite un chillido particular cuando se le ata un hilo y se gira en círculo. Sin embargo su uso más antiguo fue como alimento, durante tiempos de escasez de maíz (Vovides, *et al.*, 1983).

En muchas regiones de México, todavía las semillas se emplean como fuente de harina y se prepara masa para tortillas y atole. También en algunos lugares se usan las semillas como medicina para el tratamiento de la neuralgia (Vovides, *et al.*, 1983; Vovides y Peters, 1987; Vovides, 2000; Yáñez, 2006). Particularmente en la región Huasteca en el estado de San Luis Potosí las semillas son consumidas después de cocinarlas como tamales, simples o rellenos con huevo u otros guisos (Yáñez *et al.*, 2009).

### 2.3 Justificación

De acuerdo a un estudio etnobotánico realizado por Yáñez y colaboradores (2009) sobre la distribución y uso de *Dioon edule*, se señala la presencia de toxicidad en animales de corral por el consumo de las semillas caracterizada por: diarrea, parálisis de las patas traseras, dificultad para caminar y en algunos casos la muerte (Yáñez *et al.*, 2009). Este antecedente proporciona indicios de la posible capacidad tóxica de la especie, a pesar de ello, hasta el momento no hay estudios que identifiquen estos signos neurotóxicos tras el consumo de las semillas; sólo existe un estudio que ha demostrado la mortalidad de un 100% en roedores (*Peromyscus mexicanus*) al consumir las semillas por 7 días (González, 1989).

Por otra parte, se menciona que las personas intoxicadas con alimentos preparados con las semillas de *Dioon edule*, presentan vómito, diarrea y dificultad para caminar; también se hace mención acerca de tamales mal preparados, los cuales pueden ocasionar la muerte en humanos (Chemin, 2000). Sin embargo, tales manifestaciones hasta el momento carecen de un respaldo científico.

Por ello consideramos importante conocer la fitoquímica de las semillas y sus partes (gametofito y sarcotesta), así como caracterizar los efectos sobre la locomoción (dificultad para caminar). Este es el principal signo de toxicidad que se ha observado en animales y humanos tras el consumo de semillas. Por otra parte, este estudio nos permitirá determinar si existe una posible correlación tóxica sobre la locomoción entre el género *Dioon* y el género *Cycas* por tener origen monofilético (origen evolutivo único).

## **2.4 Hipótesis**

Las semillas de *Dioon edule* Lindl., provocan alteraciones sobre la locomoción, las cuales son similares a las observadas en los animales intoxicados con la toxina L-BMAA aislada de las semillas de *Cycas micronesica* Hill.

## **2.5 Objetivo general**

Estudiar la alteración de la locomoción en ratas expuestas a semillas de *Dioon edule* Lindl.

## **2.6 Objetivos específicos**

1. Realizar el estudio fitoquímico preliminar de las semillas y sus componentes individuales (sarcotesta y gametofito) de *Dioon edule* Lindl.
2. Evaluar el efecto sobre la alimentación y ganancia de peso de las ratas tratadas con semillas de *Dioon edule* Lindl. a tres dosis diferentes.

3. Evaluar el efecto sobre la locomoción (no restringida y campo abierto), de ratas expuestas a la semilla y sus componentes individuales (sarcotesta y gametofito) partiendo de la dosis que presente menor efecto tóxico sobre la alimentación y ganancia de peso.

### **III. MATERIALES Y METODOS**

#### **3.1 Estudio fitoquímico preliminar de la semilla y sus componentes individuales (sarcotesta y gametofito) de *Dioon edule* Lindl.**

##### **3.1.1 Recolección del material vegetal**

Se recolectaron conos femeninos maduros con peso aproximado de 1.9 a 2.1 kg en la región de La Palma (21° 47'N; 99° 28'W), localizada en el municipio de Rayón en el estado de San Luis Potosí, México. Posteriormente, los conos se llevaron a la unidad B del laboratorio del Instituto de Investigación de Zonas Desérticas, donde se sometieron a un proceso de secado a temperatura ambiente durante 15 días de acuerdo con las prácticas tradicionales. Transcurrido este tiempo se extrajeron las semillas, las cuales fueron divididas en tres grupos que correspondieron a: semilla, sarcotesta y gametofito.

##### **3.1.2 Preparación del material vegetal**

La semilla completa así como sus partes (sarcotesta y gametofito), se sometieron a un proceso de secado a temperatura ambiente de manera independiente. Posteriormente se pulverizó cada material vegetal en un molino eléctrico (Osterizer Pulsematic), y el polvo obtenido se hizo pasar a través de un tamiz No. 40 (Perfoparts, S.A. de C.V.), para unificar el tamaño de las partículas de las muestras y preparar las diferentes disoluciones tanto para el estudio fitoquímico preliminar, como para la evaluación toxicológica.

##### **3.1.3 Preparación de los extractos**

*Decocción.* En un recipiente con 20 mL de agua destilada en ebullición, se colocaron 10 g de polvo de la muestra vegetal correspondiente, por 15 minutos y

se retiró del fuego. La disolución fría, se filtró al vacío y se conservó en refrigeración hasta su posterior análisis.

*Maceración.* Se pesaron tres muestras de 10 g de polvo de la muestra vegetal y se añadieron de manera independiente 20 mL del disolvente correspondiente (hexano, cloroformo y etanol). Posteriormente se dejó macerar durante 7 días a temperatura ambiente y al abrigo de la luz. Al término de este tiempo, el contenido se filtró al vacío y se ajustó a un volumen de 20 mL.

*Extracción por calentamiento en serie.* En un matraz balón se colocaron 15 g de la muestra vegetal en polvo y se añadieron 40 mL de hexano, posteriormente se sometió a reflujo durante 30 minutos a la temperatura de ebullición del disolvente. El extracto obtenido se filtró al vacío y se dejó secar el residuo vegetal, para posteriormente repetir este procedimiento sobre el residuo con cloroformo y metanol sucesivamente. Los tres extractos obtenidos de cada muestra vegetal, se llevaron a un volumen de 30 mL con el disolvente correspondiente.

#### **3.1.4 Análisis fitoquímico cualitativo de los extractos**

El análisis consistió en detectar por medio de reacciones de coloración y precipitación la presencia de: carbohidratos, antraquinonas, saponinas, grasas, alcaloides, aminoácidos libres, taninos, lactonas sesquiterpénicas, flavonoides, heterósidos cianogénicos, glucósidos cardiotónicos y cumarinas. Los métodos para la identificación de cada uno de los grupos químicos se presentan en el anexo 1. Cada ensayo se realizó 3 veces por extracto.

### **3.2 Evaluación del efecto tóxico sobre la alimentación y ganancia de peso de las ratas expuestas a dosis diferentes de semilla de *Dioon edule* Lindl.**

El objetivo de esta parte experimental fue descartar el efecto de los tratamientos sobre el sistema nervioso, por un estado nutricional deficiente, el cual es considerado un factor confusor en estudios sobre el sistema nervioso y la locomoción.

#### **3.2.1 Modelo animal**

Se utilizaron 42 ratas macho Wistar (200 – 250 g de peso corporal), las cuales fueron proporcionadas por el Bioterio de la Facultad de Medicina de la UASLP. Los animales fueron tratados conforme a la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, de acuerdo a las especificaciones técnicas de producción, cuidado y uso de animales de laboratorio. Se les condicionó a un ciclo de luz/obscuridad de 12/12h a una temperatura controlada de  $22 \pm 1^\circ\text{C}$  y una humedad de  $50 \pm 5\%$ ; se alimentaron con una dieta estándar para roedor (Rodent laboratory Chow\* 5001; 30 g de alimento/día) y agua. Todos los animales se sometieron a un periodo de adaptación de 15 días, antes de administrar los tratamientos.

#### **3.2.2 Tratamientos**

Se prepararon suspensiones acuosas de semilla a concentraciones de 0.125 g/mL, 0.250 g/mL y 0.500 g/mL, correspondientes a las dosis de 0.5, 1 y 2 g/kg. La dosis más baja utilizada en este estudio, se seleccionó con base en estudios previos en roedores, los cuales mostraron alteraciones en la actividad locomotora después de 10 días de una exposición diaria a la toxina L-BMAA (Karamyan y Speth, 2008). Otro de los tratamientos consistió en la administración de 0.5 mL de agua destilada y por último el tratamiento con la toxina L-BMAA a dosis de 2 mg/kg (Karamyan y Speth, 2008).

### 3.2.3 Grupos experimentales

Después del periodo de adaptación, las ratas se asignaron aleatoriamente en cuatro grupos independientes (n=6). Los tratamientos se administraron diariamente durante 15 días por vía intragástrica y se monitoreó cada día el consumo de agua y alimento; el peso corporal de cada uno de los animales se registró cada tercer día.

### 3.3 Evaluación del efecto sobre la locomoción (no restringida y campo abierto) de ratas expuestas a la semilla y sus componentes (sarcotesta y gametofito)

#### 3.3.1 Locomoción no restringida

Al final del tiempo de exposición, los animales se rasuraron de la extremidad posterior izquierda, para colocarles marcas de tinta en la cintura, cadera, rodilla, tobillo y la primera falange. Cada animal se introdujo en una pasarela, cuyo piso es de acrílico transparente. A los animales se les permitió desplazarse sin restricción alguna, a lo largo de la pasarela (4 a 5 zancadas) y se les grabó en video (30 cuadros/segundo) cuando menos en dos ocasiones (Figura 7).



**Figura 7. Desplazamiento de rata en pasarela.** Marcas de tinta en ratas para la evaluación de la locomoción no restringida: cadera, cintura, rodilla, tobillo y primer falange, de arriba hacia abajo. Fotografía: E. García CH, y A. Covarrubias C.

A través del programa Pinnacle 10, se digitalizaron las imágenes contenidas en cada uno de los cuadros de grabación y consecutivamente con el programa Image J (Psion inc. NIH), se determinó las coordenadas de cada una de las marcas colocadas en las articulaciones de la pata izquierda de los animales. Las distintas coordenadas se emplearon para establecer la cinemática de los animales, para obtener las fases de flexión, extensión y soporte, así como la longitud, la duración y la velocidad de cada zancada de los animales (García, 2006).

### **3.3.2 Actividad espontánea en campo abierto**

Después del tiempo de exposición, las ratas se introdujeron de manera independiente a una caja cuyas dimensiones eran de 90 x 90 x 60cm. Se videograbó su actividad motora en ciclo de oscuridad, durante 15 minutos. Esta metodología nos permitió evaluar la actividad motora exploratoria de los animales, a través de: la velocidad promedio y la distancia recorrida por los animales (Gómez y Fusté, 1994; Evangelista, 1997; Irigoyen, et al., 1999; Prut y Belzung, 2003), por medio de un programa realizado para este propósito en el laboratorio del Dr. Ismael Jiménez Estrada del Departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias del CINVESTAV-Zacatenco.

### **3.4 Análisis estadístico**

Para el análisis estadístico de los resultados se utilizó el Software Stata 8.0 (Stata, Corp Collage Station Tx), proporcionado por el CINVESTAV-Zacatenco. Para la evaluación de los tratamientos se realizó el análisis de varianza (ANOVA) usando como prueba *post-hoc* la prueba de Bonferroni. Se consideró como valor de significancia diferencias con  $p < 0.05$ .

## IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1 Estudio fitoquímico preliminar de las semillas y sus componentes individuales (sarcotesta y gametofito) de *Dioon edule* Lindl.

El contenido por ciento de grasa (g%) en la semilla, sarcotesta y gametofito se cuantificó a través del método de extracción por Soxhlet hasta agotamiento. Se obtuvo un contenido de grasa de 0.157% en la semilla, 0.058% en el gametofito y 0.168% en la sarcotesta. Los resultados muestran que la sarcotesta posee el mayor contenido de grasa, posiblemente a esta característica se deba la preferencia del ganado y animales como el *Peromyscus* por el consumo de esta (González, 1989; Yañez, *et al.*, 2009). La determinación de presencia de almidón se realizó en el residuo de extracción de las decocciones con el reactivo de yodo, donde las tres muestras presentaron prueba positiva. Estos resultados corresponden a la naturaleza del almidón como parte de almacenamiento en las semillas (Trease y Evans, 1987; Bruneton, 1991).

Los resultados del análisis fitoquímico preliminar por reacciones de coloración y precipitación de los extractos acuosos y orgánicos de semilla, sarcotesta y gametofito de *Dioon edule* Lindl., se muestran en el cuadro 1. Donde la semilla, sarcotesta y gametofito mostraron la presencia de carbohidratos reductores, grasas, esteroides, alcaloides y aminoácidos libres.

La semilla y sarcotesta, presentaron taninos condensados, mientras que para gametofito esta reacción fue negativa. La semilla, sarcotesta y gametofito, no presentaron: lactosa, cetosas, pentosas, antraquinonas, cumarinas, lactonas sesquiterpénicas, heterósidos cianogénicos, saponinas, glucósidos cardioactivos, taninos elágicos, triterpenos y flavonoides.

La sarcotesta, en comparación con semilla y gametofito, presentó taninos hidrolizables gálicos y una mayor intensidad de coloración (mayor concentración de

grupos químicos identificados) para aminoácidos libres y alcaloides. Entre sarcotesta y semilla, esta diferencia de concentración (aminoácidos libres y alcaloides), se debe a que en la semilla, la sarcotesta representa sólo un 20% y el 80% restante le es conferido por la presencia del gametofito.

**Cuadro 1. Resultados del análisis fitoquímico preliminar de *Dioon edule* Lindl.**

Grupo Químico	Semilla	Sarcotesta	Gametofito
<b>Carbohidratos reductores</b>	+	+	+
Almidón	+	+	+
Alcaloides	+	++	+
Aminoácidos libres	+	+++	+
Esteroles	+	+	+
Grasas	+	+	+
Taninos generales	+	+	-
Taninos condensados	+	+	-
Taninos hidrolizables			
gálicos	-	+	-
Lactosa	-	-	-
Cetosas	-	-	-
Pentosas	-	-	-
Antraquinonas	-	-	-
Cumarinas	-	-	-
Lactonas sesquiterpénicas	-	-	-
Heterósidos			
cianogenéticos	-	-	-
Saponinas	-	-	-
Glucósidos cardioactivos	-	-	-
Taninos elágicos	-	-	-
Triterpenos	-	-	-
Flavonoides	-	-	-

- Prueba negativa

+ Prueba positiva (El número de cruces es proporcional a la intensidad de la coloración de la reacción, que está relacionada con la concentración del grupo funcional identificado).

De acuerdo con los resultados obtenidos de este análisis preliminar, el uso alimentario de las semillas queda corroborado por la presencia de carbohidratos, grasas y los esteroides, los cuales tienen importancia dietética (Bruneton, 1991). La presencia de los aminoácidos libres, alcaloides y taninos, por su naturaleza química, pueden ser tóxicos al ser ingeridos, ya que pueden actuar sobre el sistema nervioso central o el sistema nervioso autónomo (Trease y Evans, 1987; Bruneton, 1991; Gutiérrez, *et al.*, 2007). Lo que sugiere que estos metabolitos secundarios, pueden estar asociadas a la toxicidad de las cicadales.

#### **4.2 Evaluación del efecto tóxico sobre la alimentación y ganancia de peso de las ratas expuestas a semillas de *Dioon edule* Lindl.**

Para establecer el efecto que los tratamientos pudieran inferir sobre la alimentación de los animales, se evaluaron tres dosis de semilla (0.5, 1.0 y 2.0 g/kg), ya que la malnutrición está asociada con alteraciones sobre el sistema nervioso como cambios en el comportamiento y la locomoción (García-Ruiz *et al.*, 1994, García, 2006). A partir del tercer día de exposición a los tratamientos, los grupos de ratas expuestas a las dosis de 1.0 y 2.0 g/kg de semilla, mostraron una disminución significativa ( $p = 0.001$ ) en el consumo de alimento, manteniéndose este comportamiento hasta el término del experimento (Figura 8). El grupo de ratas tratadas con 0.5 g/kg no presentó diferencias significativas en comparación con el grupo de 2.0 ml/kg de agua.

Con relación al consumo de agua, no se observaron diferencias significativas entre los tratamientos de 0.5, 1.0 y 2.0 g/kg de semilla con respecto al grupo tratado con agua (2 mL/kg) (Figura 9).

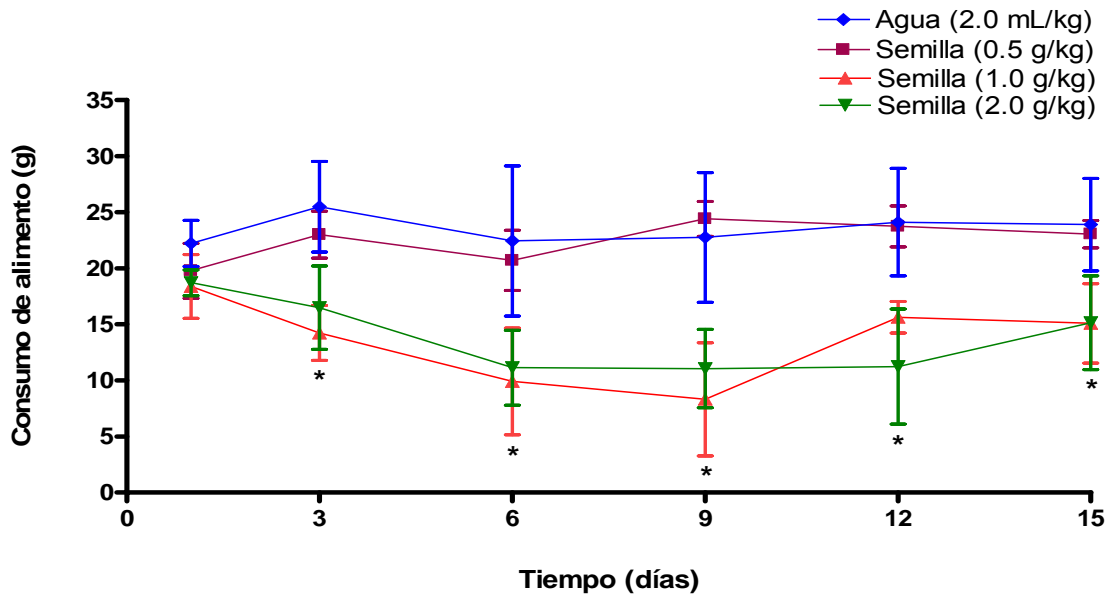


Figura 8. Efecto de las semillas de *Dioon edule* Lindl. en el consumo de alimento. Los tratamientos fueron administrados por vía intragástrica durante 15 días, los valores representan la media  $\pm$  DE, n = 6; \*p = 0.001 comparado con el grupo expuesto a 2.0 mL /kg de agua.

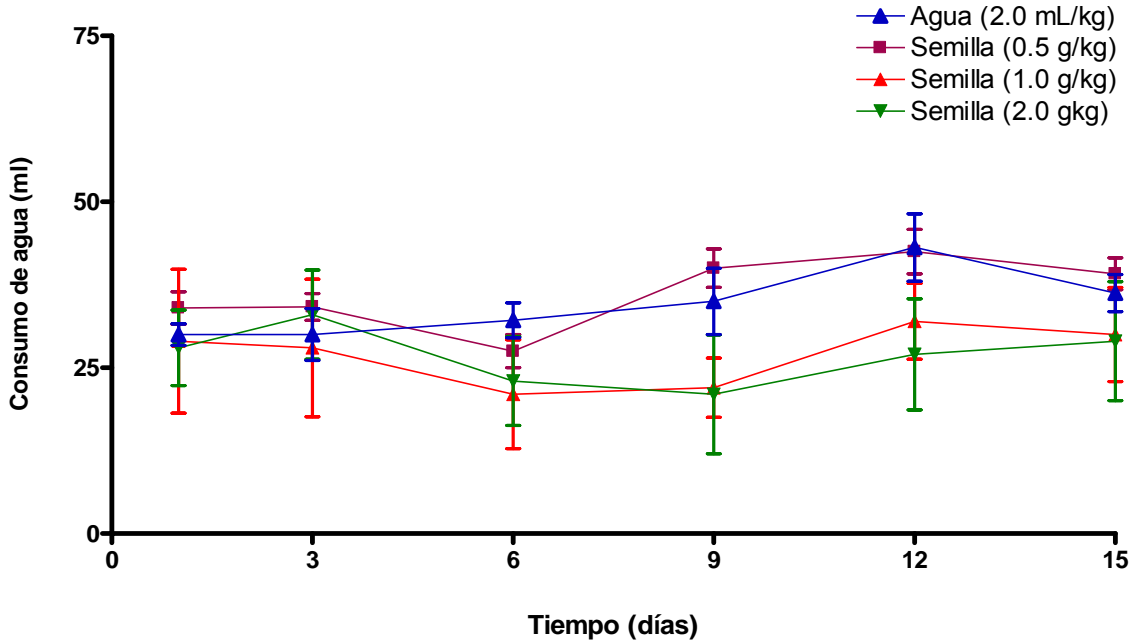
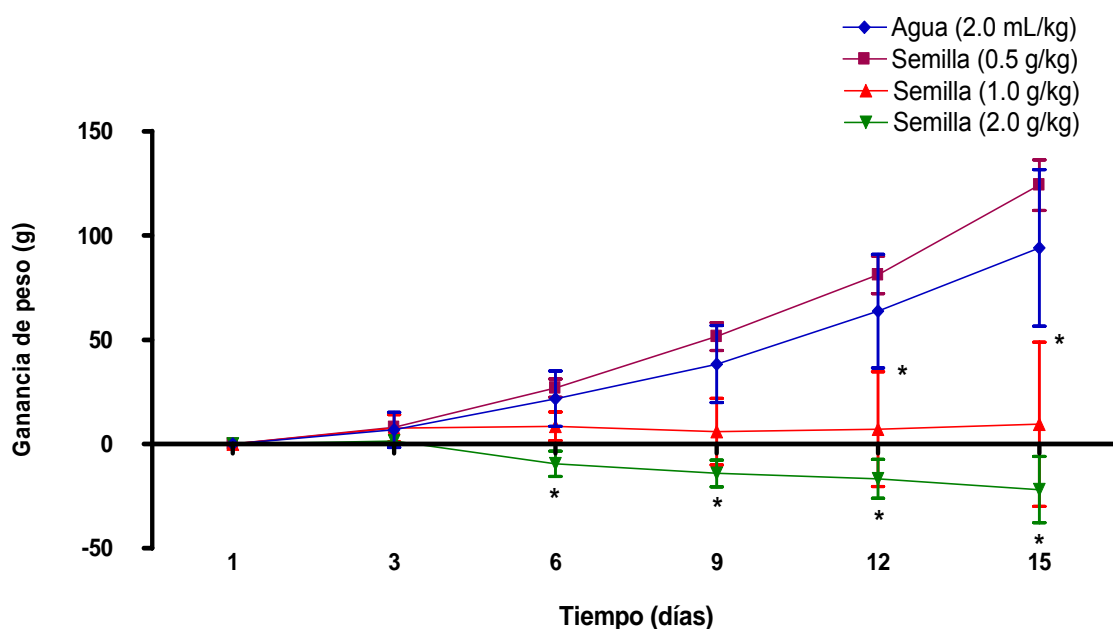


Figura 9. Efecto de las semillas de *Dioon edule* Lindl. en el consumo de agua. Los tratamiento fueron administrados por vía intragástrica durante 15 días, los valores representan la media  $\pm$  DE, n = 6; \*p = 0.001 comparado con el grupo expuesto a 2.0 mL /kg de agua.

La ganancia de peso disminuyó significativamente ( $p = 0.001$ ), a partir del sexto día en el grupo de ratas tratadas con semilla (2.0 g/kg) con respecto al grupo tratado con agua (2.0 ml/kg); mientras que el grupo con semilla (1.0 g/kg) fue significativamente diferente al doceavo día del tratamiento ( $p = 0.001$ ), comparado con el grupo tratado con agua (Figura 10). Ambos comportamientos se mantuvieron hasta el término de la exposición y no estuvieron asociados con alteraciones sistémicas como diarrea o vómito. El grupo de semilla (0.5 g/kg), no mostró diferencias con el grupo tratado con agua.



**Figura 10. Efecto de las semillas de *Dioon edule* Lindl. sobre la ganancia de peso.** Los tratamientos fueron administrados por vía intragástrica durante 15 días, los valores representan la media  $\pm$  DE,  $n = 6$ ; \* $p = 0.001$  comparado con el grupo expuesto a 2.0 mL /kg de agua.

De acuerdo con los resultados anteriores, el grupo de ratas tratadas con las dosis de 1.0 y 2.0 g/kg, mostraron efectos sobre la alimentación de los animales, reflejado en la ausencia y pérdida de ganancia de peso durante el tiempo de exposición a los tratamientos.

Tales alteraciones, pueden estar relacionadas con la presencia de taninos condensados en la semilla, los cuales tienen la capacidad de formar complejos insolubles con las proteínas y otras macromoléculas, afectando negativamente la energía metabolizable y la disponibilidad de proteína. Este complejo tanino-proteína, es considerado como el responsable del bajo nivel de crecimiento, baja digestibilidad de proteína y disminución de aminoácidos aprovechados e incremento de nitrógeno excretado en animales de corral (Romero, 2000).

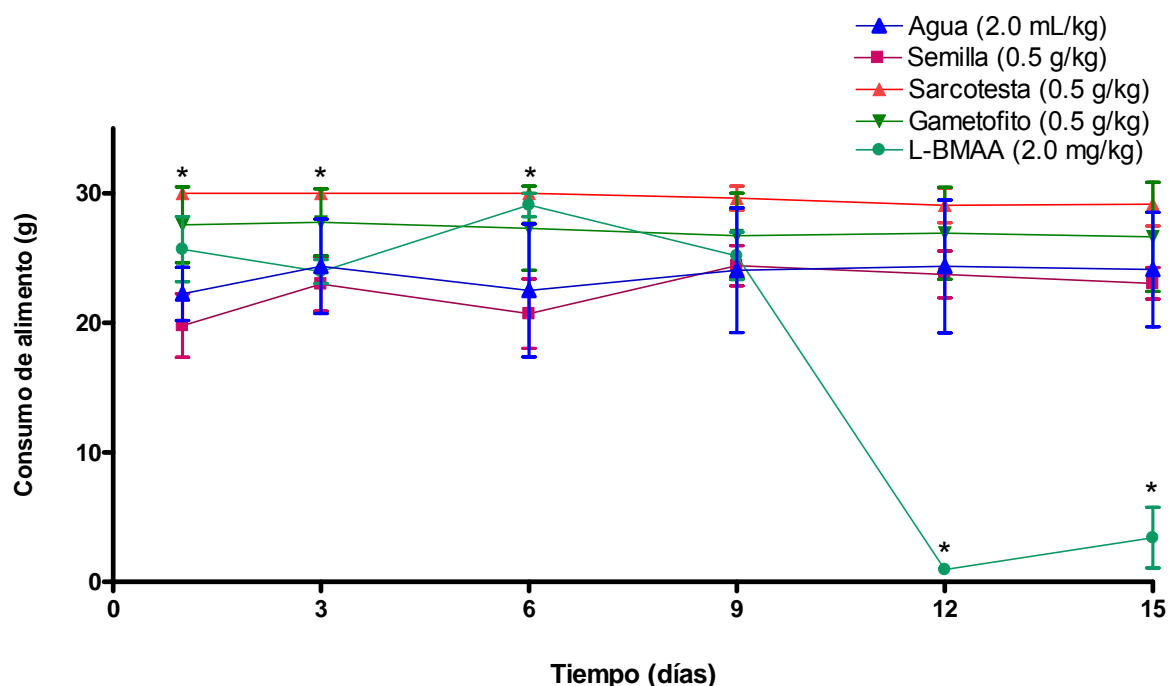
Además, las enzimas digestivas como la amilasa, lipasa y tripsina son fuertemente inhibidas, afectando en esta forma la digestibilidad de proteínas, grasas y almidones (Romero, 2000). Por otra parte, los taninos también inducen una respuesta negativa cuando son consumidos, debido a su sabor astringente, amargo o desagradable. Esto puede generar una respuesta de rechazo principalmente al alimento y no al consumo de agua, lo cual se puede relacionar con efectos antinutricionales, reflejados en los resultados previamente descritos, y que pueden dar origen a la presencia de alteraciones sobre el sistema nervioso.

En relación a estos hallazgos, se seleccionó la dosis de 0.5 g/kg de semilla, por mostrar un comportamiento similar al grupo tratado con agua (2.0 mL/kg). Con esta dosis se llevaron a cabo los experimentos para evaluar los componentes individuales de la semilla (sarcotesta y gametofito), sobre la alimentación, ganancia de peso y locomoción (no restringida y en campo abierto).

#### **4.3 Evaluación del efecto tóxico sobre la alimentación y ganancia de peso de las ratas expuestas a semillas y sus componente individuales (sarcotesta y gametofito) de *Dioon edule* Lindl.**

Se evaluó el efecto de la especie *Cycas*, a través de su toxina L-BMAA, con la finalidad de valorar la existencia de una relación tóxica entre las especies.

Los tratamientos de gametofito y semilla no mostraron diferencias significativas durante el experimento (Figura 11). El grupo de ratas expuestas a sarcotesta (0.5 g/kg), mostró un aumento significativo en el consumo de alimento al inicio del tratamiento hasta el sexto día de tratamiento, en comparación con el grupo tratado con agua. Por otra parte, el grupo de ratas expuestas a L-BMAA, presentó una disminución considerable en el consumo de alimento a partir del doceavo día y hasta el término del tiempo de exposición (Figura 11).



**Figura 11. Efecto de *Dioon edule* Lindl. en el consumo de alimento.** Los tratamientos fueron administrados por vía intragástrica durante 15 días, los valores representan la media  $\pm$  DE, n = 6; \*p < 0.001 comparado con el grupo expuesto a 2.0 mL/kg de agua.

Los efectos observados sobre el consumo de alimento, en el grupo de animales tratados con L-BMAA pueden deberse a la capacidad de este aminoácido no proteico en acumularse en el hipocampo (Duncan, *et al.*, 1991), región cerebral cuya función está relacionada en la regulación de la conducta alimentaria a través

de los centros hipotalámicos de la saciedad y la ingesta de líquidos y la sed (Afifi y Bergman, 1999). En relación al efecto observado en el grupo de ratas tratadas con sarcotesta, de acuerdo al estudio fitoquímico, existe la presencia importante de aminoácidos libres, por lo que consideramos probable que estos pudieran incidir en el hipocampo principalmente en los centros cerebrales relacionados en la regulación de la saciedad (Afifi y Bergman, 1999).

Por otra parte, es posible que la presencia de alcaloides, identificados en el estudio fitoquímico, pudieran tener inferencia sobre la activación de los receptores cannabinoides (CB1) localizados en el hipocampo, los cuales están relacionados en la inducción de hiperfagia en roedores de experimentación (Mabry, 2001).

El grupo de ratas tratadas con gametofito y L-BMAA mostraron una disminución significativa en el consumo de agua ( $p < 0.01$ ), a partir del doceavo día hasta el término del experimento en comparación con el grupo de animales tratados con agua. Tal manifestación sugerimos que pudiera estar relacionada a la interacción del L-BMAA sobre las regiones lateral y anterior del hipotálamo (Duncan, *et al.*, 1991), debido que alteraciones en esta región, están asociadas a la supresión de la sed (Afifi y Bergman, 1999). En relación al tratamiento de gametofito, la presencia de aminoácidos libres puede estar asociada a este mismo efecto, debido a que no hubo diferencia significativa entre ambos tratamientos (Figura 12).

Los resultados obtenidos en el grupo de animales tratados con sarcotesta y semilla (0.5 g/kg), no mostraron diferencias en el consumo de agua entre los grupos, en comparación con el grupo tratado con agua (Figura 12).

Las alteraciones de los tratamientos de gametofito y L-BMAA sobre el consumo de alimento y agua, no afectaron la ganancia de peso de los animales (Figura 13), sin embargo, es evidente la existencia de la interacción de estos, sobre el sistema nervioso.

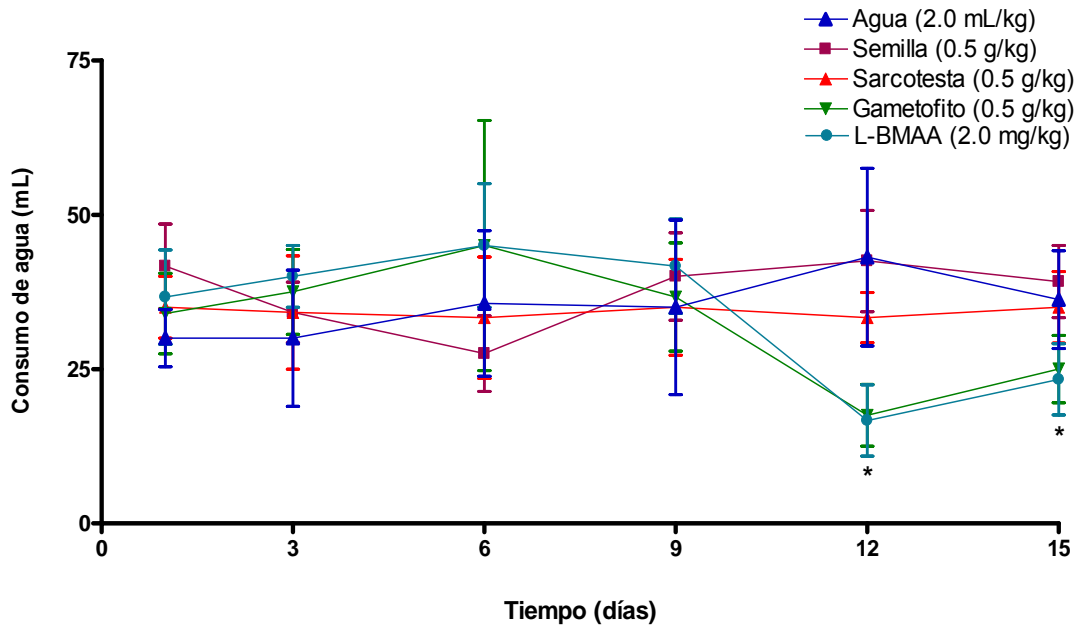


Figura 12. Efecto de *Dioon edule* Lindl. en el consumo de agua. Los tratamiento fueron administrados por vía intragástrica durante 15 días, los valores representan la media  $\pm$  DE, n = 6; \*p < 0.001 comparado con el grupo expuesto a 2.0 mL /kg de agua.

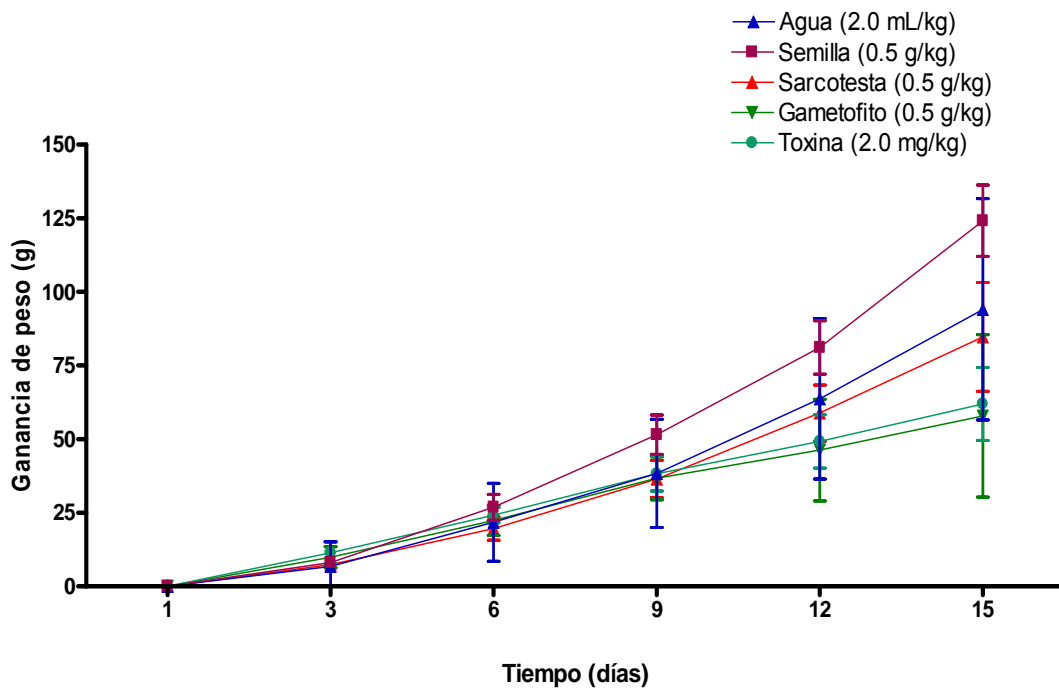


Figura 13. Efecto de *Dioon edule* Lindl. sobre la ganancia de peso. Los tratamiento fueron administrados por vía intragástrica durante 15 días, los valores representan la media  $\pm$  DE, n = 6; \*p < 0.05 comparado con el grupo expuesto a 2.0 mL /kg de agua.

#### **4.4 Evaluación del efecto sobre la locomoción (no restringida y campo abierto) de ratas expuestas a la semilla y sus componentes (sarcotesta y gametofito)**

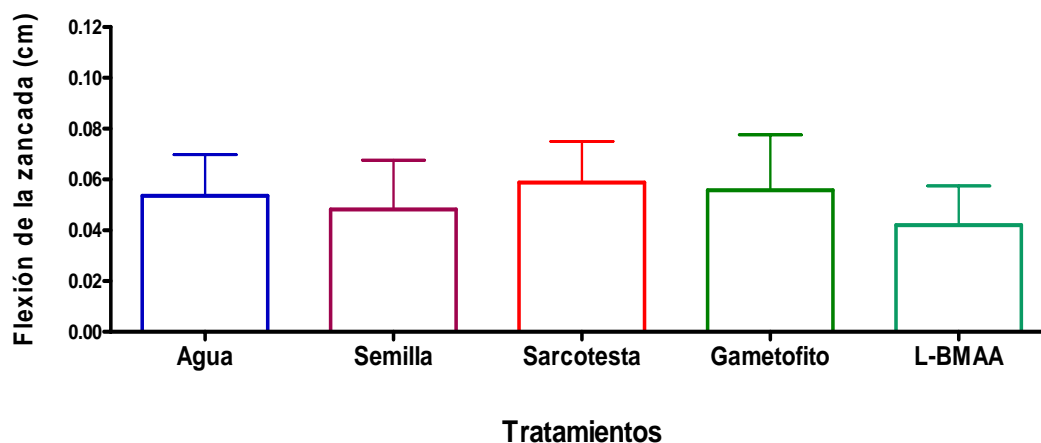
La locomoción es un proceso complejo ampliamente coordinado por el sistema nervioso, su ejecución, iniciación y velocidad están controlados por redes que reciben simultáneamente señales de sistemas sensoriales y del cerebelo, del tronco encefálico y de la corteza cerebral, estas últimas bajo influencia de los ganglios basales. Los sistemas de control mencionados anteriormente, permiten a cada organismo generar las sinergias de flexión y extensión de las extremidades (Büschges, 2005). Ello facilita la adaptación del individuo a su medio ambiente a través de variaciones en la velocidad, dirección y estilo de paso que le permite corregir las perturbaciones existentes (Grillner, 1975; Jiménez, 1998). De acuerdo con lo anterior, las modificaciones en la locomoción, podrían estar asociadas a alteraciones sobre los sistemas reguladores del sistema nervioso (Büschges, 2005, García, 2006). Por ello, la evaluación de la locomoción es una herramienta útil para medir los daños que los tratamientos de semilla, sarcotesta, gametofito y L-BMAA pudieran tener sobre el sistema nervioso.

##### **4.4.1 Análisis locomoción no restringida**

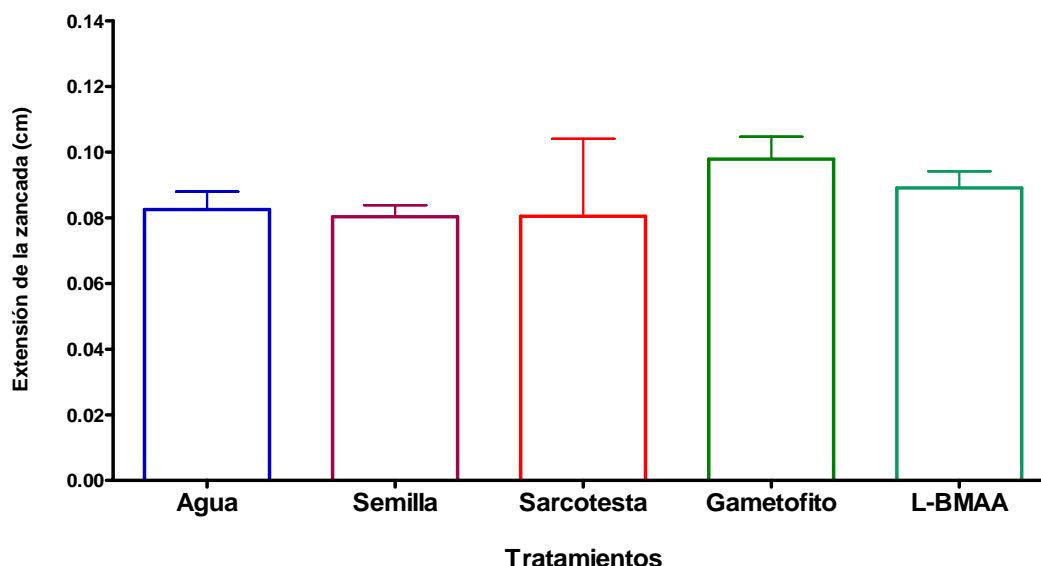
Los resultados obtenidos en el análisis de locomoción no restringida, no mostraron diferencias significativas en los parámetros de flexión y extensión de las ratas con los tratamientos de semilla, gametofito, sarcotesta y L-BMAA con respecto al grupo de ratas tratadas con agua (2.0 mL/kg) (Figuras 14 y 15). Lo anterior se traduce, en que existe una adecuada activación secuencial de los músculos flexores y extensores, reflejada en la actividad de neuronas reticulo-espinales, células encargadas de la activación de las motoneuronas flexoras y extensoras (Grillner, 1975; Jiménez, 1998).

Sin embargo, en el análisis de la fase de soporte sólo el grupo de animales tratados con semilla mostró una disminución significativa ( $p < 0.05$ ), con respecto al

grupo tratado con agua (Figura 16). Tal efecto se tradujo en una disminución del tiempo en el que el animal apoya su peso corporal en sus cuatro patas (Jiménez, 1998).

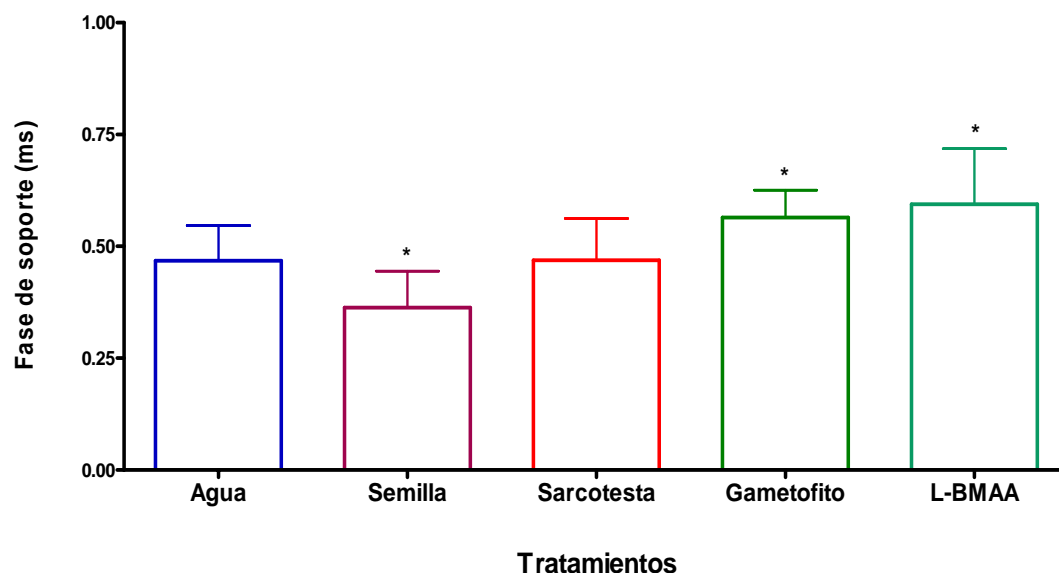


**Figura 14. Análisis de la flexión en la locomoción no restringida de la rata.** Las barras representan los diferentes tratamientos: agua (2.0 mL/kg); semilla, sarcotesta y gametofito (0.5 g/kg) y L-BMAA (2.0 mg/kg). Los valores representan la media  $\pm$  DE.  $p < 0.05$ , comparado con el grupo expuesto a 2.0 mL /kg de agua.



**Figura 15. Análisis de la extensión en la locomoción no restringida de la rata.** Las barras representan los diferentes tratamientos: agua (2.0 mL/kg); semilla, sarcotesta y gametofito (0.5 g/kg) y L-BMAA (2.0 mg/kg), los valores representan la media  $\pm$  DE.  $p < 0.05$ , comparado con el grupo expuesto a 2.0 mL /kg de agua.

Por otra parte, el grupo de animales tratados con gametofito y L-BMAA, mostraron un incremento significativo en el tiempo de la fase de soporte con respecto al grupo tratado con agua (Figura 16).

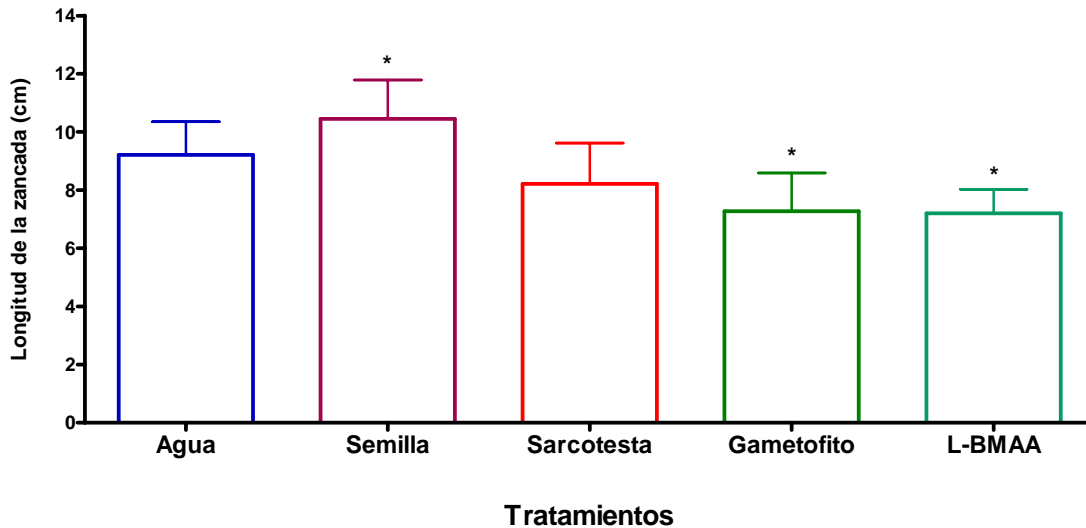


**Figura 16. Análisis de la fase de soporte en la locomoción no restringida de la rata.** Las barras representan los diferentes tratamientos: agua (2.0 mL/kg); semilla, sarcotesta y gametofito (0.5 g/kg) y L-BMAA (2.0 mg/kg), los valores representan la media  $\pm$  DE. \* $p < 0.05$ , comparado con el grupo expuesto a 2.0 mL /kg de agua.

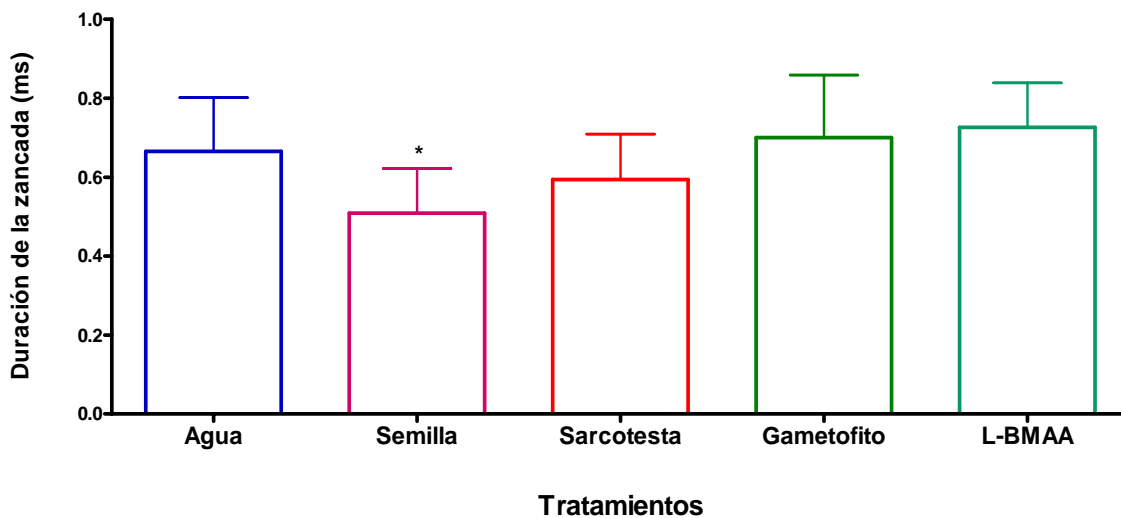
Las ratas pertenecientes al grupo de semilla, mostraron un incremento significativo ( $p < 0.05$ ) en el parámetro cinemático de longitud. Tal efecto fue contrastante con lo observado con los grupos de ratas expuestas a gametofito y L-BMAA, dado que estos presentaron una disminución significativa en comparación con el grupo de animales tratados con agua (Figura 17).

En relación a la duración de la zancada, solo el grupo tratado con semilla (0.5 g/kg) mostró una reducción significativa (Figura 18), pero mostró un incremento considerable en la velocidad de la zancada en comparación con los demás tratamientos ( $p < 0.01$ ) (Figura 19). Por otra parte, el grupo de ratas tratadas

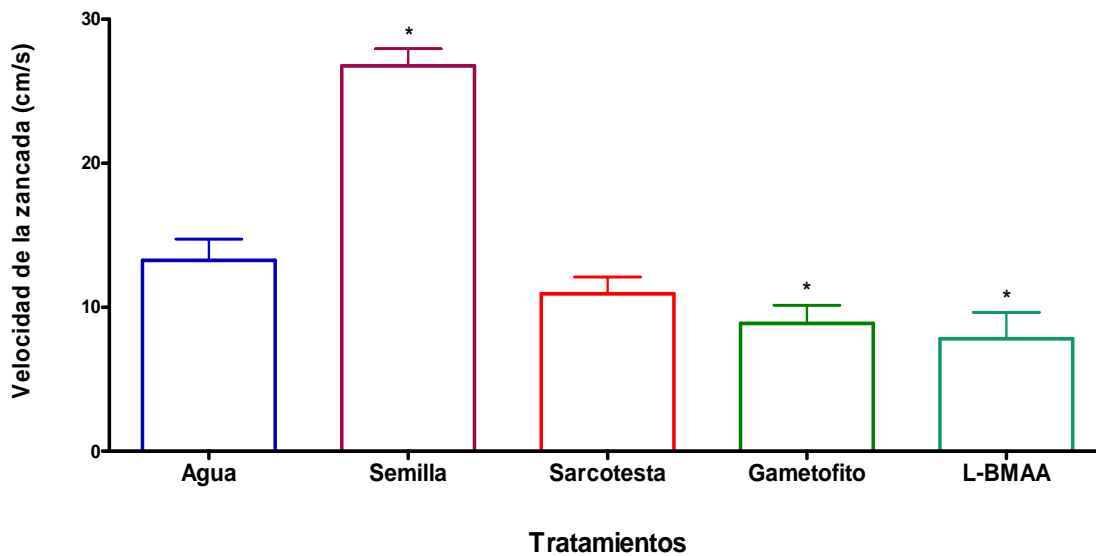
con gametofito y L-BMAA presentaron una disminución en su velocidad ( $p < 0.01$ ), con respecto al grupo con agua (2.0 mL/kg) (Figura 19).



**Figura 17. Análisis de la longitud de la zancada en la locomoción no restringida de la rata.** Las barras representan los diferentes tratamientos: agua (2.0 mL/kg); semilla, sarcotesta y gametofito (0.5 g/kg) y L-BMAA (2.0 mg/kg), los valores representan la media  $\pm$  DE. \* $p = 0.05$ , comparado con el grupo expuesto a 2.0 mL /kg de agua.



**Figura 18. Análisis de la duración de la zancada en la locomoción no restringida de la rata.** Las barras representan los diferentes tratamientos: agua (2.0 mL/kg); semilla, sarcotesta y gametofito (0.5 g/kg) y L-BMAA (2.0 mg/kg), los valores representan la media  $\pm$  DE. \* $p < 0.001$ , comparado con el grupo expuesto a 2.0 mL /kg de agua.



**Figura 19. Análisis de la velocidad de la zancada en la locomoción no restringida de la rata.** Las barras representan los diferentes tratamientos: agua (2.0 ml/kg); semilla, sarcotesta y gametofito (0.5 g/kg) y L-BMAA (2.0 mg/kg), los valores representan la media  $\pm$  DE. \* $p < 0.001$ , comparado con el grupo expuesto a 2.0 mL /kg de agua.

De acuerdo con los resultados obtenidos en el análisis de locomoción no restringida, es importante puntualizar que la longitud de la zancada, se incrementa de manera lineal con la velocidad, y por consecuencia hay una disminución en la duración de la zancada, así como una disminución de la fase de soporte (Grillner, 1975), tal y como se observó en el grupo expuesto a la semilla (Figura 16, 17, 18 y 19). Este comportamiento se traduce en un desplazamiento rápido, además, las ratas presentaron un comportamiento agresivo y excitado. Esta respuesta, posiblemente se deba a la presencia de los alcaloides en la semilla. Algunos alcaloides, como los alcaloides tropánicos (hiosciamina y atropina) presentan cierta afinidad sobre los receptores colinérgicos centrales, provocando a dosis elevadas una notable excitación. Otro ejemplo de ellos es la cocaína, que actúa sobre el sistema nervioso central, estimulando funciones sensoriales y motoras, disminuyendo la sensación de fatiga (Trease y Evans, 1987; Bruneton, 1991).

Los efectos observados entre el grupo tratado con semilla (desplazamiento rápido) y gametofito (desplazamiento lento), son controversiales, debido a que ambos tratamientos comparten la presencia de los metabolitos secundarios del gametofito (80% del total de la semilla es gametofito), y no presentan el mismo comportamiento; aunado a que el grupo tratado con sarcotesta por sí sola, no presentó ningún efecto. Tal hecho, nos hace sugerir lo siguiente: El efecto excitatorio del tratamiento con semilla, posiblemente se debe a factores toxicocinéticos, es decir, la participación en conjunto de los metabolitos de gametofito y sarcotesta (a pesar que está en menor proporción en la semilla completa (20%)), pueden modificar la absorción, distribución, metabolismo y eliminación de los metabolitos secundarios, haciéndolos biodisponibles para ejecutar su acción sobre el sistema nervioso.

Por otra parte, existe la posibilidad de que alcaloides con diferentes características estereoquímicas, logren efectos sobre vías de señalización o con interacción ligando-receptor. Estos efectos estarán sujetos a los gradientes de concentración y a su acción como agonista o antagonista, o bien como inhibidores inespecíficos. Por lo que tales posibilidades son sugeridas, debido a los resultados encontrados en este trabajo (activación e inhibición de la locomoción).

Estudios realizados en roedores sobre sustancias agonistas e inhibidores no selectivos del receptor de serotonina (5-HT), del sistema serotoninérgico (Prut y Belzung, 2003), muestran la importancia de este neurotransmisor sobre la locomoción, mostrando que el bloqueo del receptor de serotonina aunado a la síntesis del mismo es un punto crítico en la regulación de desplazamiento.

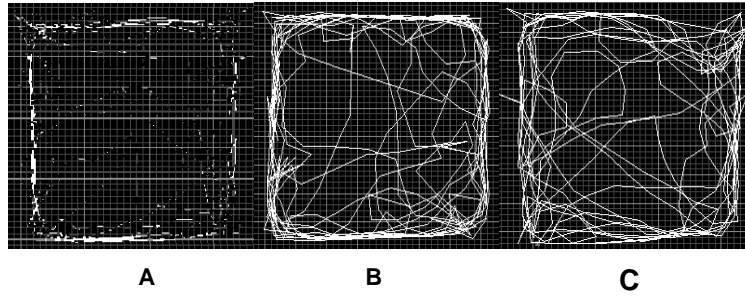
Por otro lado, las neuronas serotoninérgicas contienen la enzima triptófano-hidroxilasa, que convierte el triptófano en 5-hidroxitriptófano (5-HTP) y la otra enzima implicada en la síntesis de serotonina es la descarboxilasa de los aminoácidos L-aromáticos (aminoácido descarboxilasa: AADC), que convierte 5-HTP en 5-HT. La AADC está presente no sólo en las neuronas serotoninérgicas

sino también en las neuronas catecolaminérgicas, donde convierte 3,4-dihidroxifenilalanina (DOPA) a dopamina (Afifi y Bergman, 1999). La relevancia de esta enzima es que participa de manera importante en la síntesis de dopamina, neurotransmisor crítico en la regulación de los movimientos en los ganglios basales y que el déficit de ésta da origen a la presencia de Parkinson, enfermedad partícipe de la toxicidad de las cícadas (Purdie, *et al*, 2009). De acuerdo con lo anterior existe la posibilidad de que los metabolitos secundarios actúan a nivel de inhibición enzimática.

En relación a los efectos observados con el tratamiento de gametofito y L-BMAA, en donde se observó una disminución de la actividad motora, se ha establecido que este aminoácido no proteico, comparte una similitud estructural al neurotransmisor glutamato (Mabry, 2001; Karlsson, *et al.*, 2009; Purdie, *et al*, 2009). Este aminoácido tiene una función excitatoria por la apertura de canales iónicos en el cerebro, el cual puede llevar a un desbalance del calcio citosólico neuronal, resultando en un comportamiento anormal, provocando temblores, debilidad de las extremidades, irritabilidad y locomoción lenta (Mabry, 2001). De acuerdo con lo anterior, el tratamiento con gametofito posiblemente comparte el efecto tóxico del L-BMAA. Sin embargo, es necesario realizar experimentos complementarios para establecer su relación.

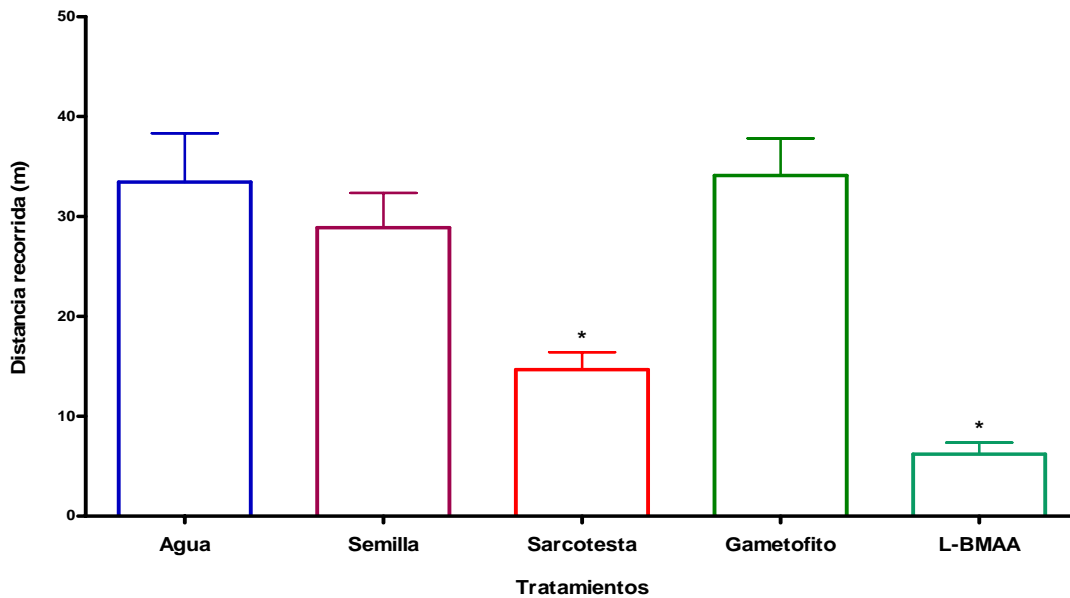
#### **4.4.2 Análisis en campo abierto**

El análisis de la locomoción en campo abierto, es un procedimiento muy conveniente no sólo para medir ansiedad, sino también la sedación o el desplazamiento de los animales (Evangelista, 1997). Con los diagramas obtenidos para cada tratamiento sobre el desplazamiento de las ratas (Figura 20), se estableció la distancia recorrida y la velocidad promedio de la locomoción en campo abierto.



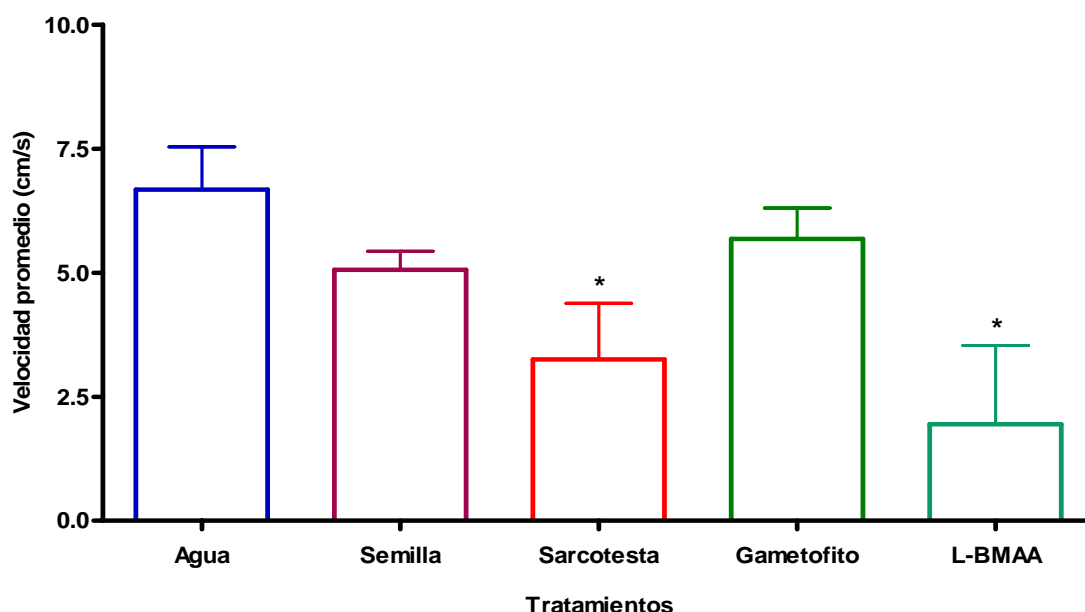
**Figura 20. Diagrama del desplazamiento de las ratas en campo abierto.** La figura muestra los desplazamientos representativos de los grupos con diferencias significativas. A) agua (2.0 mL/kg); B) sarcotesta (0.5 g/kg); C) L-BMAA (2.0mg/Kg).

Los grupos de ratas tratadas con sarcotesta de *Dioon edule* Lindl., mostraron una disminución significativa en la distancia recorrida alrededor del campo ( $p < 0.05$ ), en comparación con el grupo tratado con agua. Por otra parte, el grupo tratado con L-BMAA presentó un decremento considerable en la distancia recorrida en comparación con todos los tratamientos (Figura 21).



**Figura 21. Análisis de la distancia recorrida en la locomoción de la rata en campo abierto.** Las barras representan los diferentes tratamientos: agua (2.0 mL/kg); semilla, sarcotesta y gametofito (0.5 g/kg) y L-BMAA (2.0 mg/kg), los valores representan la media  $\pm$  DE. \* $p < 0.05$ , comparado con el grupo expuesto a 2.0 mL /kg de agua.

El tratamiento con sarcotesta (0.5 g/kg) y L-BMAA, mostraron una disminución significativa en la velocidad promedio del desplazamiento en comparación con el grupo tratado con agua (Figura 22). Sin embargo entre ambos tratamientos no se observó diferencia.



**Figura 22. Velocidad promedio de desplazamiento de la rata en campo abierto.** Las barras representan los diferentes tratamientos: agua (2.0 mL/kg); semilla, sarcotesta y gametofito (0.5 g/kg) y L-BMAA (2.0 mg/kg), los valores representan la media  $\pm$  DE. \* $p < 0.001$ .

La disminución en la distancia recorrida y la velocidad promedio en los grupos de animales tratados con sarcotesta y L-BMAA, pudo interpretarse como un efecto ansiogénico (disminución significativa de la exploración de espacios abiertos y desconocidos)(Pascual, *et al.* 2003; Prut y Belzung, 2003). Tal efecto nuevamente puede estar asociado a cambios químicos inducidos en la función nerviosa (Irigoyen, *et al.*, 1999), a través posiblemente del sistema serotoninérgico. Por ejemplo a través de sus receptores, los cuales, están presentes en alta densidad en el hipocampo, región cerebral blanco del L-BMAA (Duncan, *et al.*, 1991), en el hipotálamo, neocórtex séptum y amígdala (Afifi y Bergman, 1999).

Muchas de estas áreas terminales, son componentes del sistema límbico, el cual implica la modulación de la emoción. Por lo que proponemos que éste, es afectado por la administración de sarcotesta y L-BMAA, esto porque la prueba determina la exploración y la reactividad emocional, lo que se reflejó como una disminución del desplazamiento en ambos tratamientos.

Debido a esto, el mecanismo de toxicidad puede deberse a la incidencia en los receptores serotoninérgicos ya que estos pueden modular la liberación de otros neurotransmisores, como la acetilcolina, neurotransmisor que participa de manera importante en la unión neuromuscular (Afifi y Bergman, 1999) y que su inhibición por alcaloides induce a alteraciones sobre la locomoción y parálisis, entre otros efectos.

Algunos alcaloides tropánicos, como la atropina y la hiosciamina, presentan cierta afinidad sobre los receptores colinérgicos centrales, provocando a dosis muy bajas, una acción depresiva poco marcada y a dosis elevadas notable excitación. La escopolamina, manifiesta una importante actividad central, ya que a dosis elevadas es un notable “incapacitante”, originando trastornos en la locomoción. El beleño es un parasimpaticolítico débil y posee propiedades sedantes del sistema nervioso central (Trease y Evans, 1987; Bruneton, 1991).

Entre los alcaloides piperidínicos no derivados del metabolismo de la lisina, se encuentra laconiina (cicutina), causante de la disminución de la motilidad y de la sensibilidad, así como de parálisis progresiva de los músculos. La nicotina (alcaloide derivado del ácido nicotínico), estimula el SNC (Trease y Evans, 1987; Bruneton, 1991).

Lo descrito anteriormente, coincide con las alteraciones descritas en el estudio etnobotánico sobre el consumo de semillas de *Dioon edule* Lindl. (Yañez et al., 2009) para los humanos y los animales, como: parálisis de las patas traseras y dificultad para caminar. Estos efectos también se observaron en el proyecto de

investigación. Por tal motivo, estas alteraciones se pueden asociar a la presencia de alcaloides presentes en la semilla, sarcotesta y gametofito.

Por ello, consideramos que los efectos sobre la actividad motora de las ratas tratadas con *Dioon edule* Lindl, se deben a la presencia de compuestos que actúan sobre el sistema nervioso de manera multifactorial.

De acuerdo con los resultados del estudio fitoquímico preliminar, la semilla, el gametofito, y la sarcotesta presentaron aminoácidos libres, los cuales pueden actuar como reserva nitrogenada o ser tóxicos para el hombre y animales domésticos. Se ha descrito que la ingesta de semillas de diferentes especies de Almortas (*Lathyrus sp.*, Leguminosas), proporcionan una importante cantidad de aminoácidos libres responsables de provocar rigidez y disminución de la fuerza muscular de las piernas y parálisis progresiva de los miembros inferiores (Bruneton, 1991). Tales manifestaciones se presentaron en el grupo de animales expuestos a L-BMAA (aminoácido no proteico).

En relación a la presencia de alcaloides, estos principios activos se caracterizan por presentar una marcada acción fisiológica en el ser humano y en animales, ya que ejercen su actividad sobre diversos órganos y sistemas, como el sistema nervioso simpático y parasimpático (Trease y Evans, 1987; Bruneton, 1991; Gutiérrez, *et al.*, 2007).

## V. CONCLUSIONES

- Las semillas y los componentes individuales de *Dioon edule* Lindl. mostraron efectos sobre la locomoción no restringida y en campo abierto, a dosis de 0.5g/kg. Tal alteración está asociada a la presencia de metabolitos secundarios como: alcaloides y aminoácidos libres, los cuales tienen una participación importante sobre la excitación e inhibición del sistema nervioso.
- Los efectos sobre la locomoción en campo abierto del tratamiento con sarcotesta y la toxina L-BMAA fueron similares, lo que sugiere que la especie *Dioon* comparte la toxicidad con la especie *Cycas micronesica* Hill. Sin embargo, será necesario realizar estudios posteriores para identificar la especie química responsable de tales efectos.

## **VI. PERSPECTIVAS**

- Evaluar el efecto de los tratamientos a través de un análisis de memoria espacial.
- Caracterizar la naturaleza química de los aminoácidos libres, para identificar si corresponden al aminoácido no proteico L-BMAA.
- Evaluar el efecto sobre la actividad electrofisiológica de nervios periféricos sensoriales y motores de las ratas tratadas con sarcotesta y L-BMAA.

## VII. ANEXO 1. Pruebas para el análisis fitoquímico

### CARBOHIDRATOS

Para la identificación de carbohidratos se evaluaron únicamente las decocciones de semilla completa, sarcotesta y gametofito, mediante las reacciones de antrona, Fehling, ácido mícico, Seliwanoff y la prueba de Orcinol.

#### a) *Reacción de antrona.*

**Fundamento:** La antrona forma un complejo verde en medio ácido fuerte (ácido sulfúrico) con ciertos carbohidratos y sacáridos, en especial con azúcares y almidones. La reacción de la antrona (9,10-dihidro-9-cetoantraceno) en medio sulfúrico produce un derivado del furano que tiene su máximo de absorción en 620 nm (Domínguez, 1979).

En un tubo de ensaye se colocaron 0.5 mL del extracto y se añadió por la parte interior 0.5 mL de antrona en medio ácido (2 mg de antrona en 2 mL de ácido sulfúrico concentrado) y se dejó reposar 10 minutos. La presencia de un anillo verdoso en la interfase fue indicativo de una prueba positiva.

#### b) *Reacción de Fehling.*

**Fundamento:** Los azúcares reductores (monosacáridos y algunos disacáridos como la lactosa, maltosa, celobiosa y gentobiosa) se oxidan en presencia de sulfato cúprico en un medio alcalino, formando óxido cuproso (precipitado rojo ladrillo). La reacción de Fehling se fundamenta en el poder reductor del grupo carbonilo de un aldehído. Éste se oxida a ácido y reduce la sal de cobre (II) en medio alcalino a óxido de cobre (I), formando un precipitado de color rojo ladrillo (Trease y Evans, 1987).

A 0.5 mL del extracto se le adicionaron 2 mL de cada uno de los reactivos de Fehling (solución de sulfato cúprico pentahidratado, solución de hidróxido de

potasio, tartrato de sodio y potasio en agua) y se calentó a baño maría durante 8 minutos. La prueba fue positiva cuando se forma un precipitado rojo ladrillo.

**c) *Reacción de ácido mícico.***

**Fundamento:** Este ensayo permite la identificación de la galactosa o de los azúcares que la contienen. El ácido nítrico oxida tanto al grupo aldehído como al alcoholico primario de cualquier azúcar para originar ácidos dicarboxílicos que han recibido el nombre general de ácidos aldáricos (Trease y Evans, 1987).

Se mezclaron 0.5 mL del extracto con 0.5mL de ácido nítrico concentrado en una cápsula de porcelana, se dejó evaporar hasta un volumen de 0.5 mL para posteriormente dejarlo reposar 24 horas. La presencia de cristales de ácido mícico, indican la presencia de lactosa u otro oligosacáridos que contenga galactosa.

**d) *Reacción de Seliwanoff.***

**Fundamento:** Las cetosas en el carbono 2 tienen una función cetona, que en presencia de un ácido fuerte producen rápidamente derivados furfúricos que reaccionan con un difenol llamado resorcinol que está contenido en el reactivo de Seliwanoff. La sacarosa (un disacárido formado por glucosa y fructosa) da positiva la reacción, ya que el HCl del reactivo provoca en caliente la hidrólisis del compuesto liberando fructosa (responsable de la reacción positiva) (Trease y Evans, 1987).

En un tubo de ensaye se colocaron 0.5 mL del extracto, 0.5 mL de reactivo de Seliwanoff (ácido clorhídrico y resorcinol), y 1 mL de HCl al 25%, se llevó a baño maría durante 10 minutos. La apariencia de un color rojo cereza, indica la presencia de cetosas por ejemplo: fructosa.

#### **e) Prueba de orcinol.**

**Fundamento:** Esta es una reacción general para las pentosas en el transcurso de la cual, por calentamiento en presencia de ácido fuerte; se forman derivados deshidratados de las mismas denominados furfurales, y reaccionan con el orcinol para rendir una mezcla de productos de condensación de color verde (Trease y Evans, 1987).

Se calentaron 2 mL de reactivo (0.3 g de orcinol en 100 mL de ácido clorhídrico concentrado y 5 gotas de cloruro de hierro (III) al 10%) en un tubo de ensaye a baño maría a temperatura de ebullición, posteriormente se añadieron 0.5 mL del extracto. La presencia de un color azul verdoso es positiva para la identificación de pentosas.

### **ANTRAQUINONAS**

La identificación de antraquinonas totales se realizó con las tres muestras, mediante el ensayo de Börntrager modificado para Heterósidos antraquinónicos y C-heterósidos.

#### ***Ensayo de Börntrager modificado para Heterósidos antraquinónicos y C-heterósidos.***

**Fundamento:** Las antraquinonas pueden estar presentes como heterósidos y se hidrolizan en medio ácido. Los C-heterósidos son fuertemente resistentes a la hidrólisis ácida normal, pero pueden ser hidrolizados y a la vez ser oxidados con cloruro férrico. Las antraquinonas reaccionan con bases y desarrollan coloraciones rojo, rosa o violeta (Trease y Evans, 1987).

En este ensayo se realizó una hidrólisis ácida oxidativa para hidrolizar completamente los compuestos que pudieran ser resistentes a la hidrólisis ácida o básica normal, y a la vez oxidar todos los derivados presentes a antraquinona.

Para la cual se colocaron 0.5 mL del extracto derivado de la decocción y se agregaron 5.0 mL de cloruro férrico al 5% y 5.0 mL de ácido clorhídrico al 10%.

Esta mezcla se puso a hervir a baño maría durante 10 minutos. Con la mezcla se llevó a cabo la extracción por partición en embudo de separación con 10 mL de éter etílico y se dejó separar las fases, para posteriormente recuperar la fase orgánica.

Se colocó 1 mL de la fase orgánica y 1 mL de disolución de KOH al 10% en un tubo de ensaye y se agitó. La prueba es positiva por el cambio de coloración en la fase acuosa dando tonalidades de color rojo, rosa o violeta, decolorándose la fase etérea. La prueba se repitió con disolución de amoniaco concentrado. Un color rosa o rojo cereza en la fase acuosa es indicativa de la presencia de este grupo químico.

## **SAPONINAS**

Las saponinas se identificaron utilizando la decocción, mediante la prueba de la espuma; y los extractos hexánico, clorofórmico, etanólico y metanólico para la realización de pruebas generales de grupos esteroidales con la reacción de Liebermann-burchard y de terpenos con la reacción de Rosenthaler.

### **a) Prueba de espuma.**

**Fundamento:** los heterósidos llamados saponinas producen un cambio en la tensión superficial del agua lo que se manifiesta con la formación de abundante espuma con una altura superior a 8mm, la cual permanece estable por 15 minutos, cuando son agitadas sus soluciones (Trease y Evans, 1987).

Las decocciones se agitaron fuertemente durante 4 minutos. La formación de espuma estable por 15 minutos y con una altura superior a 8 mm, fue indicativo de la presencia de saponinas.

### **b) Prueba Liebermann-Burchard.**

**Fundamento:** Las saponinas insaturadas o con hidroxilos de núcleo tipo esteroideal, triterpenoide tetracíclicas dan colores con reactivos ácidos (Domínguez, 1979).

Esta reacción es una prueba general para el núcleo esteroideal, que puede encontrarse formando parte de las saponinas esteroidales. Se colocaron 0.5 mL de los extractos orgánicos, en tubos de ensaye y se agregó 1 mL del reactivo de Liebermann-Burchard (anhídrido acético/ácido sulfúrico 19:1 y 0.5 mL de ácido acético glacial). Se considera como prueba positiva si hay formación de colores azul, verde, amarillo, rojo, anaranjado y negro, que aparecen a 0, 1, 5, 20 y 60 minutos.

### **c) Reacción de Rosenthaler.**

**Fundamento:** Los triterpenos y las saponinas de tipo triterpenoide pentacíclicas reaccionan con la vainillina en presencia de ácido sulfúrico y producen un color violeta (Domínguez, 1979).

Esta reacción es una prueba general para triterpenoides. En diferentes tubos de ensaye se colocaron 0.5 mL de los extractos orgánicos y se agregaron 2 gotas de disolución de vainillina al 1% en etanol y 2 gotas de ácido sulfúrico concentrado. La aparición de un color violeta, indica que la reacción es positiva.

## **GRASAS**

La determinación de grasas se realizó a través de los siguientes procedimientos:

### **a) Reacción con Sudán III.**

**Fundamento:** El reconocimiento de los lípidos se realiza con el colorante Sudán III (colorante diazo) que tiñe las grasas selectivamente de color rojo-anaranjado (Domínguez, 1979).

Se colocaron 0.5 mL de los extractos hexánico y clorofórmico en diferentes tubos de ensaye, posteriormente se añadieron 0.5 mL de cloroformo y se colocaron unas gotas de Sudán III (solución saturada de Sudán III en alcohol de 70°). Una prueba positiva desarrolla un color rojo intenso.

**b) Extracción de grasas sólido-líquido.**

**Fundamento:** El extractor en serie Soxhlet es idóneo para realizar extracciones de compuestos, generalmente de naturaleza lipídica, contenidos en un sólido, a través de un solvente afín (Bruneton, 1991).

Se colocaron 15 g de la muestra semilla completa, sarcotesta o gametofito, empaquetada dentro de un cartucho de papel filtro y se colocó en un aparato de extracción Soxhlet, se agregó cloroformo y posteriormente se llevaron a cabo 4 ciclos de reflujo. Una vez concluido este proceso, la mezcla disolvente-aceite se colocó en una cápsula de porcelana previamente secada y tarada. Se dejó evaporar el disolvente a temperatura ambiente y se pesó la cápsula para determinar el peso de aceite y reportarlo como rendimiento en gramos por ciento (g %).

**c) Contenido de grasa (g%).**

**Fundamento:** La materia grasa es disuelta en un disolvente orgánico que se elimina por evaporación o se recupera por destilación. La materia grasa se puede pesar para establecer el % que representa en la muestra.

Se colocaron los extractos obtenidos con el extractor Soxhlet en cápsulas previamente secas y taradas, se dejó evaporar el solvente a temperatura ambiente para posteriormente pesar la cápsula para determinar el peso de grasa y se reportó el contenido en g%.

## ALCALOIDES

Para la identificación de alcaloides se trabajó con la decocción, el extracto clorofórmico, etanólico y metanólico, los cuales se analizaron mediante las reacciones de Dragendorff, Meyer, Wagner, Hager y Sonnenchein.

### ***Reacciones de Dragendorff, Meyer, Wagner, Hager y Sonnenchein.***

**Fundamento:** Casi todos los alcaloides forman precipitados al ser tratados en sus disoluciones ácidas o neutras con reactivos específicos. Las disoluciones de varios ácidos de metales pesados como silico-tungstico, cloro-platínico, fosfomolibdico, forman precipitados amorfos o cristalinos con mayoría de los alcaloides. Forman compuestos de coordinación con los reactivos de Meyer, Dragendorff, Wagner que contienen metales pesados, o sales de ácidos orgánicos como con el reactivo de Hager (Trease y Evans, 1987).

En una placa excavada de porcelana se colocó 1 gota del extracto en las diferentes excavaciones y 1 gota de los reactivos de Dragendorff (solución de Yoduro potásico-bismútico), Meyer (solución de yoduro potásico-mercúrico), Wagner (solución de yodo en yoduro potásico), Hager (solución saturada de ácido pícrico), y Sonnenchein (solución de fosfomolibdato de sodio en ácido nítrico). Posteriormente se determinó como prueba positiva las formación de precipitados, grumos o floculación.

## AMINOÁCIDOS LIBRES

Para determinar la presencia de aminoácidos libres se utilizó la decocción y los extractos metanólico y etanólico, mediante la reacción con ninhidrina en solución acuosa al 1% y posteriormente la confirmación mediante un análisis cromatográfico en capa fina.

**Fundamento:** La ninhidrina reacciona con los grupos alfa aminoácidos libres de los aminoácidos. La reacción da una coloración azul-violeta dependiendo de la cantidad de grupos liberados en la hidrólisis previa (Trease y Evans, 1987).

Se colocaron 0.5 mL de los extractos decocción, metanólico y etanólico de manera independiente, en tubos de ensaye y se añadió 0.5 mL del reactivo de ninhidrina en solución acuosa al 1%, se calentó por 5 minutos en baño maría. La reacción se considera positiva por la presencia de una coloración violeta.

### ***Análisis cromatográfico en capa fina (Prueba confirmatoria).***

**Fundamento:** Esta técnica cromatográfica es utilizada, entre otros posibles usos, para separar los componentes que forman parte de una mezcla y los cuales se identifican por el color que desarrollan al ser atomizadas con reactivos específicos (Trease y Evans, 1987).

Para este análisis se utilizó:

- El extracto de decocción y metanólico.
- Adsorbentes: Se utilizaron cromatoplasmas de sílica gel F-2501.
- Sistemas de disolventes: etanol-tolueno-ácido acético glacial 6-3-1 v/v.
- Agente Cromogénico: Ninhidrina al 1% en acetona.

## **TANINOS**

Para la identificación de Taninos se evaluó la decocción y el extracto etanólico por medio del ensayo de la gelatina, de la Fenazona, de Stiasny, de la catequina, del ácido clorogénico, del ácido gálico, de la reacción de  $\text{FeCl}_3$ , de oxidación de taninos catéquicos, de la reacción con yodato de potasio, con ácido nitroso/ácido acético y con vainillina/ácido clorhídrico concentrado.

### ***Ensayo de la gelatina.***

**Fundamento:** Los taninos son precipitantes de proteínas y debido a la naturaleza proteica de la gelatina, es precipitada por ellos (Domínguez, 1979; Trease y Evans, 1987).

A 0.5 mL del extracto se le añadieron 3 gotas de una solución de gelatina al 1% en solución de cloruro de sodio al 10%. Es considerada una prueba positiva por la precipitación de proteínas (turbidez en el tubo).

### ***Ensayo de la fenazona.***

**Fundamento:** Todos los taninos dan un precipitado coposo y, con frecuencia, coloreado (Trease y Evans, 1987; Bruneton, 1991).

Se colocaron 0.1 g de fosfato ácido de sodio en 1 mL del extracto, y se dejó calentar en baño maría a temperatura inferior a ebullición durante 3 minutos. Posteriormente se adicionaron 3 gotas de fenazona al 2%. La presencia de un precipitado coposo y coloreado se considera como una prueba positiva.

### ***Reacción de FeCl<sub>3</sub>.***

**Fundamento:** Los taninos hidrolizables (galitaninos y elagitaninos) se colorean de azul-negro y los taninos condensados (catéquicos) dan color verde con sales férricas (Bruneton, 1991).

En un tubo de ensaye se colocó 1 mL del extracto y se añadieron 2 gotas de cloruro de sodio al 1% y 2 gotas de cloruro férrico al 5%. Si se observaba una coloración azul-negrusca había taninos gálicos y la coloración verde denotaba la presencia de taninos catéquicos.

### ***Ensayo de Stiasny.***

**Fundamento:** Los catecol-taninos son precipitados de sus soluciones por el formol en medio ácido (Bruneton, 1991).

En un tubo de ensaye se colocaron 0.5 mL del extracto y 1 mL del reactivo de Stiasny (formol al 30%) y se calentó a baño maría a temperatura inferior a ebullición durante 30 minutos. La formación de grumos floculentos indica la presencia de taninos catéquicos.

### ***Reacción de oxidación de taninos catéquicos.***

**Fundamento:** los taninos catéquicos o condensados se oxidan en polifenoles rojos por calentamiento con ácido clorhídrico (Trease y Evans 1987).

A 1 mL del extracto se adicionó 0.5 mL de HCl concentrado y se calentó por 5 minutos después de ebullición. La prueba es positiva cuando se observa una coloración rojiza, debida a la formación de flobáfenos o rojos catéquicos.

### ***Ensayo de la catequina.***

**Fundamento:** las catequizas por calentamiento con ácidos forman floroglucinol que es detectado por modificaciones del ensayo de lignina (Trease y Evans, 1987).

Se humedeció una astilla de madera con el extracto, se dejó secar y se humedeció con HCl concentrado y nuevamente se dejó secar posteriormente se calentó con la flama de un encendedor. Una coloración rosa o roja en la madera indica una prueba positiva.

### ***Ensayo del ácido clorogénico.***

**Fundamento:** El ácido clorogénico produce una coloración verde cuando se trata con una solución acuosa de amoniaco y se expone al oxígeno atmosférico (Bruneton, 1991).

En un tubo de ensaye se colocaron 0.5 mL del extracto y se añadieron 0.5 mL de solución de amoniaco al 10% y se dejó reposar. La producción de una coloración verde indica la presencia de ácido clorogénico.

### ***Reacción de yodato de potasio.***

**Fundamento:** El anión yodato forma con tanino un complejo de color rosa (Bruneton, 1991).

A 0.5 mL del extracto se añadió 0.1 g de cristales de Yodato de potasio. La aparición de una coloración rosa se considera como positiva.

### ***Reacción de ácido nitroso/ácido acético.***

**Fundamento:** Los elagitaninos colorean rosa, púrpura y azul (Bruneton, 1991).

A 0.5 mL del extracto se añadió 0.1 g de cristales de nitrito de sodio y 3 gotas de ácido acético. La presencia de colores como: rosa, púrpura y azul, se considera una prueba positiva.

### ***Reacción de vainillina/HCl.***

**Fundamento:** Los taninos condensados colorean rojo (Trease y Evans, 1991).

A 0.5mL del extracto se añadieron 2 gotas vainillina en de etanol al 1% y 2 gotas de HCl concentrado. La presencia de un color rojo es considerada como prueba positiva.

## **LACTONAS SESQUITERPÉNICAS**

La identificación de las lactonas sesquiterpénicas se realizó evaluando el extracto clorofórmico, etanólico y metanólico a través de la reacción de hidroximato férrico.

### ***Reacción de hidroximato férrico.***

**Fundamento:** Las sesquiterpelactonas forman fácilmente hidroximatos férricos de color violeta o púrpura en medio ácido (Domínguez, 1979).

En un tubo de ensaye se colocaron 0.5 mL del extracto, se añadió una gota de la solución metanólica 2 N de clorhidrato de hidroxilamina y una gota de solución metanólica de 2 N de hidróxido de potasio, luego se llevó a una placa calefactora a calentamiento lento por 2 minutos. Posteriormente se aciduló con ácido clorhídrico 0.5 N y se añadió una gota de cloruro férrico al 1%. La prueba es positiva para santonina si se presenta un color rosa violeta y para alantolactona si se observa un color violeta oscuro.

## **FLAVONOIDES**

Para la identificación de flavonoides se utilizó la decocción, el extracto clorofórmico, etanólico y metanólico.

### ***Reacción de Shinoda.***

**Fundamento:** Los productos reducidos de flavonoides manifiestan diversas coloraciones en medio ácido (Domínguez, 1979).

En un tubo de ensaye se colocaron 0.5 mL del extracto, se añadió 0.1 mg de magnesio metálico y 3 gotas de HCl concentrado. La reacción es positiva para flavonas, flavonoles, flavononoles o xantonas, cuando se presentó una coloración anaranjada, roja, o violeta.

## **CUMARINAS**

**Fundamento:** Estos compuestos altamente fluorescentes se identifican a través de una placa cromatográfica desarrollada, en la cual la fluorescencia es, desde luego, más marcada si se examina a la luz UV y es utilizada para la visualización cromatográfica de estos compuestos (Bruneton, 1991).

Para la identificación de cumarinas se utilizó:

- La decocción, el extracto hexánico, clorofórmico, etanólico y metanólico, mediante cromatografía en capa fina.
- Adsorbentes: Se utilizaron cromatoplasmas de sílica gel F-2501.
- Sistemas de disolventes: Cloroformo-etanol 9-1 v/v.
- Agente Cromogénico: Hidróxido de Amonio.

La presencia de manchas fluorescentes azul, azul verde o violeta en las cromatoplasmas observadas bajo luz UV, demuestra la presencia de Cumarinas.

## **HETERÓSIDOS CIANOGENÉTICOS**

Para la identificación de heterósidos cianogénéticos se efectuó la prueba de descomposición enzimática, se utilizó la muestra seca molida de semilla, sarcotesta y gametofito.

### ***Prueba de la descomposición enzimática.***

**Fundamento:** Los heterósidos cianogénéticos son hidrolizados por acción enzimática, por solventes y ácidos, se producen geninas, aldehído benzóico y ácido cianhídrico volátil. Los vapores de éste son detectados por la coloración roja que producen en un papel impregnado con el reactivo de Grignard. Hay formación de purpurado de sodio (Bruneton, 1991).

En tubos de ensaye se colocaron las muestras y se añadió 1 mL de agua y tres gotas de xilol; sin tocar la mezcla se colocó una tira de papel previamente humedecida con el reactivo de Grignard (picrato de sodio), y se selló herméticamente dejando una pequeña parte de la tira afuera; se calentó el tubo a baño maría a 50°C durante 15 minutos. La aparición de manchas rojas sobre la tira indica la presencia de heterósidos cianogénéticos.

## HETEROSIDOS CARDIOTÓNICOS

Para los heterósidos cardiotónicos se evaluó la decocción, el extracto hexánico, clorofórmico, etanólico y metanólico, mediante las reacciones de Baljet y Kedde.

### ***Prueba de Baljet.***

**Fundamento:** Es una reacción indirecta porque identifica el núcleo esteroidal (ciclo lactónico) presente de la genina de estos compuestos, el cual reacciona con el ácido pícrico y produce una coloración roja (Domínguez, 1979).

En un tubo de ensaye se colocaron 0.5 mL del extracto y en seguida se le agregaron 2 gotas de la solución de ácido pícrico al 1% en etanol y 2 gotas de hidróxido de sodio al 10%. La reacción se considera positiva por la aparición de una coloración roja o naranja oscura.

### ***Reacción de Kedde.***

**Fundamento:** es una reacción inespecífica al identificar únicamente los grupos metílicos libres presentes en estos compuestos los cuales reaccionan con 3,5-dinitrobenzoico y producen la coloración azul o violeta (Domínguez, 1979).

Se colocaron tres gotas del extracto sobre un cuadro de papel filtro y se dejó secar, luego se añadió una gota del ácido 3,5-dinitrobenzoico al 2% en metanol y una gota de KOH al 5.7% en agua. Un color violeta o azul que desaparece en un intervalo de 1 a 2 horas indica que la prueba es positiva.

## VIII. ANEXO 2. Glosario de términos botánicos.

**Ápice.** Término usual empleado en botánica en el sentido corriente en cuanto nos referimos al *ápice geométrico* del órgano respectivo.

**Catáfilo.** Se llama así a las hojas inferiores. A menudo son escamiformes y suelen carecer de clorofila.

**Folíolo** (del lat. *Foliolum*, dim. De *folium*, hoja). Dícese de la lamina foliar articulada sobre el raquis de una hoja o sobre las divisiones del mismo, como en las hojas de los altramuces, de los tréboles y de la robinia.

**Folíolo basal.** Folíolo que surge de la base de la planta.

**Fusiforme.** Con forma de huso, estrecho y alargado.

**Gametofito.** Estructura haploide multicelular de las plantas haplo-diplontes (con alternancia de generaciones gametofítica y esporofítica).

**Lanceolado.** Aplícase a los órganos laminares como hojas, brácteas, pétalos., de figura de hierro de lanza, angostamente elípticos y apuntados en ambos extremos, como las hojas de adelfa.

**Macrosporofilo.** Esporofilo que lleva los macrosporangios.

**Megasporofilo.** Hoja especializada, cerrada sobre sí misma, que forma parte del gineceo. En su interior se forman los primordios seminales.

**Ovado.** Dícese de los órganos laminares como hojas, pétalos etc., de figura de huevo, colocado de manera que su parte más ancha corresponde a la inferior del órgano que se trata.

**Pecíolo.** Pezón o rabillo que une la lamina de la hoja a la base foliar o al tallo.

**Raquis.** Se aplica comúnmente al eje principal de una inflorescencia, y también al nervio medio de una hoja compuesta, donde están insertados los folíolos.

**Sarcotesta.** Capa externa del tegumento del óvulo de algunas Gimnospermas.

## IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Afifi, A. K. and R. A. Bergman. 1999. Neuroanatomía funcional. Texto y Atlas. Mc Graw-Hill Interamericana. México, D.F.
- Banack S. A. and P. A. Cox. 2003. Distribution of the neurotoxic nonprotein amino acid BMAA in *Cycas micronesica*. Botanical Journal of the Linnean Society. 143: 165–168.
- Brener, E. D., D. W. Stevenson and R. W. Twigg. 2003a. Cycads: evolutionary innovations and the role of plant-derived neurotoxins. Trends in Plant Science. 8(9): 446-452.
- Brener, E. D., D. W. Stevenson, R. W. McCombie, M. S. Katari, S. A. Rudd, K. F. X. Mayer, P. M. Palenchar, S. J. Runko, R. W. Twigg, G. Dai, R. A. Martienssen, P. N. Benfey and G. M. Coruzzi. 2003b. Expressed sequence tag analysis in *Cycas*, the most primitive living seed plant. Genome Biology. 4(12): R78.1-R78.11.
- Bruneton, J. 1991. Elementos de Fitoquímica y de Farmacognosia. Acribia. Zaragoza, España. 594 p.
- Büschges, A. 2005. Sensory control and organization of neural networks mediating coordination of multisegmental organs for locomotion. Journal of Neurophysiology. 93: 127-1135.
- Chemin, B. H. 2000. Recetario pame de San Luis Potosí y Querétaro. Cocina Indígena y Popular. Consejo Nacional para la Cultura y las Artes. México, D.F. 26. 158 p.
- CITES, 2003. Examen del comercio significativo de la CITES (Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestres). Cícadas (Noviembre de 2003). PC14 Doc. 9.2.2. Anexo 1.
- Cox, P. A., S. A. Banack and S. J. Murch. 2003. Biomagnification of cyanobacterial neurotoxins and neurodegenerative disease among the Chamorro people of Guam. Proceedings of the National Academy of Sciences. 100(23): 13380–13383.
- Domínguez, X. A. 1979. Métodos de Investigación Fitoquímica. Limusa. México, D.F. pp. 1-281.

- Duncan, W. M., N. E. Villacreses, P. G. Pearson, L. Wyatt, S. I. Rapoport, I. J. Kopin, S. P. Markey and Q. R. Smith. 1991. 2-Amino-3-(methylamino)-propanoic acid (BMAA) pharmacokinetics and blood-brain barrier permeability in the rat. *The journal of pharmacology and experimental therapeutics*. 258 (1): 27-35.
- Evangelista, De D. A. M. 1997. Neurotoxicidad y comportamiento del sistema nervioso. *CIENCIA HOY*. 7(38): 1-8.
- García, Ch. E. 2006. Evaluación de la marcha y de propagación del impulso nervioso en nervios periféricos de ratas tratadas subcrónicamente con Arsenito. Participación del estrés oxidativo. Tesis de doctorado en ciencias (toxicología), CINVESTAV-Zacatenco, México. pp. 20-30.
- García, R. M., L. Parra y S. Díaz C. 1994. Los efectos de la desnutrición sobre los procesos de aprendizaje y memoria en modelos animales. *Revista Biomédica*. 5: 88-108.
- Gómez, J. V. y A. Fusté E. 1994. Medición de la conducta murina en el campo abierto: criterios de agregación. *Revista de Psicología general y aplicada*. 47(3): 285-288.
- González, C. A. 1990. Algunas interacciones entre *Dioon edule* (Zamiaceae) y *Peromyscus mexicanus* (Rodentia: Cricetidae). *La Ciencia y el Hombre*. 1: 77-92.
- González, A. J., A. P. Vovides, M. M. Ferrer and C. Iglesias. 2003. Population genetics of *Dioon edule* Lindl. (Zamiaceae, Cycadales): biogeographical and evolutionary implications. *Biological Journal of the Linnean Society*. 80: 457-467.
- González, A. J., A. P. Vovides, A. Cruz A., P. Octavio A. and C. Iglesias. 2005. Allozyme variation in the three extant populations of the narrowly endemic cycad *Dioon angustifolium* Miq. (Zamiaceae) from North-eastern Mexico. *Annals of Botany*. 95: 999-1007.
- Grillner, S. 1975. Locomotion in vertebrates: central mechanisms and reflex interaction. *Physiological Reviews*. 55 (2): 248-250.
- Grillner, S. 1981. Control of locomotion in bipeds, tetrapods and fish. *Handbook of Physiology*. Section 1. The Nervous System II Motor Control. V. B. Brooks. American Physiological Society, Waverly Press. Maryland. pp 1179-1236.

- Gutiérrez, H., R. Gutiérrez, E. Herles, M. Hernández, P. Horna, P. Hoyos, C. Huby, M. Jiménez, L. Jiménez, A. Kollmann, B. Castañeda, L. Ibáñez y C. Scotto. 2007. Análisis comparativo de la toxicidad del extracto acuoso en cocimiento de la harina de maca (*Lepidium meyenii*, Walp) en tres especies de animales modelos: Artemia franciscana (*Crustácea, Anostraca*), pez Guppy (*Poecilia Reticulata*) y ratón (*Mus musculus*). Revista Horizonte Médico (7)2: 103-108.
- Hill, K. D., D. W. Stevenson and R. Osborne. 2007. The world list of cycads. Memoirs of the New York Botanical Garden. 97: 454-483. En línea: The cycad pages. The world list of cycads.
- Ince, P. G. and G. A. Codd. 2005. Return of the cycad hypothesis – does the amyotrophic lateral sclerosis/parkinsonism dementia complex (ALS/PDC) of Guam have new implications for global health? Neuropathology and Applied Neurobiology. 31: 345–353.
- Irigoyen, J. J., M. Y. Jiménez, A. López C. y J. F. Huerta. 1999. Análisis de Comportamiento en Campo Abierto. Revista Sonorense de Psicología. 13(2): 30-46.
- IUCN (2009). IUCN (the International Union for Conservation of Nature) red list of threatened species. Versión 2009.1. <http://www.iucnredlist.org>.
- Jiménez, E. I. 1998. La locomoción en los vertebrados. Elementos. 31 (5): 25-31.
- Karamyan, V. T. and R. C. Speth. 2008. Animal models of BMAA neurotoxicity: A critical review. Life Sciences. 82: 233-246.
- Karlsson, O., E. Roman, E. B. Brittebo. 2009. Long-term cognitive impairments in adult rats treated neonatally with  $\beta$ -N-methylamino-l-alanine (BMAA). Toxicological sciences. 112(1):185-195.
- Mabry, T. J. 2001. Selected topics from forty years of natural products research: betalains to flavonoids, antiviral proteins, and neurotoxic nonprotein amino acids. Journal of natural products. 64 (12): 1596-1604.
- Murch, S. J., P. A. Cox and S. A. Banack. 2004. A mechanism for slow release of biomagnified cyanobacterial neurotoxins and neurodegenerative disease in Guam. Proceedings of the National Academy of Sciences. 101(33): 12228–12231.

- Pascual, R., M. Catalán y M. Fuentealba. 2003. Rasgos de ansiedad y alteraciones neuronales en la corteza prefrontal medial, ocasionadas por experiencias adversas tempranas. *Revista Chilena de neuro-psiquiatría*. 41(3): 201-211.
- Pérez, F. M. A., A. P. Vovides, P. Octavio A., J. González A., J. Cruz R., R. Hernández J. and S. M. Villalobos M. 2006. Demography of the cycad *Ceratozamia mirandae* (Zamiaceae) under disturbed and undisturbed conditions in a biosphere reserve of Mexico. *Journal of Plant Ecology*. 187: 97–108.
- Pérez, C. F. y E. Soto. 2007. Neurotoxinas en los alimentos. *Elementos: Ciencia y Cultura*. 14 (66): 47-50.
- Prut, L. and C. Beltzung. 2003. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. *European Journal of Pharmacology*. 463: 3-33.
- Purdie, E. L., S. Samsudin, F.B. Eddy and G. A. Codd. 2009. Effects of the cyanobacterial neurotoxin b-*N*-methylamino-L-alanine on the early-life stage development of zebrafish (*Danio rerio*). *Aquatic Toxicology*. pp.1-6. En prensa.
- Purves, D., G. J. Augustine, D. Fitzpatrick, L. C. Katz, A. LaMantia y J. O. McNamara. 2001. *Invitación a la neurociencia*. Editorial Médica Panamericana. pp. 153-155.
- Romero, L. C. E. 2000. Efecto del pastoreo con ovinos sobre la concentración de taninos condensados en *Gliricidia sepium* (Jacq) Walp en el trópico seco. Tesis de maestría en ciencias pecuarias. Universidad de Colima. México. pp. 20-30.
- Schneider, D., M. Wink., F. Sporer and P. Lounibos. 2002. Cycads: their evolution, toxins, herbivores and insect pollinators. *Naturwissenschaften*. 89: 281–294.
- Spencer, P. S. 2003. Food toxins, ampa receptors, and motor neuron diseases. *Drug Metabolism Reviews*. 31: 561-587.
- Steward, I., P. M. Webb, P. J. Schluter and G. R. Shaw. 2006. Recreational and occupational field exposure to freshwater cyanobacteria – a review of anecdotal and case reports, epidemiological studies and the challenges for epidemiologic assessment. *Environmental Health*. 5(6): 1-13.
- Tortora G. J. and S. R. Grabowski. 2002. *Principios de Anatomía y Fisiología*. 9ª edición. Oxford University Press. México, D.F. 385 p.

- Trease, G. E. and W.C. Evans. 1987. Tratado de Farmacognosia. Interamericana. México, D.F. 844 p.
- Treutlein, J. and M. Wink. 2002. Molecular phylogeny of cycads inferred from *rbcL* sequences. *Naturwissenschaften* 89: 221-225.
- Van Emmerik., R. E., R. C. Wagenaar and E. E. H. Van Wegen. 1998. Interlimb coupling patterns in human locomotion: are we bipeds or quadrupeds? neuronal mechanisms for generating locomotor activity. *Annals of the New York Academy of Sciences*. Staff. New York, New York. 860: 359.
- Vovides, A. P., J. D. Rees. y M. Vázquez T. 1983. *Zamiaceae*. Flora de Veracruz. INIREB, Xalapa, Veracruz, México. Vol. 26.
- Vovides A. P. y C. M. Peters. 1987. *Dioon edule*: La planta más antigua de México. *Ciencia y Desarrollo*. 13(73): 19-24.
- Vovides, A. P. 1990. Spatial distribution, survival, and fecundity of *Dioon edule* (*Zamiaceae*) in a tropical deciduous forest in Veracruz, México, with notes on this habitat. *American Journal of Botany*. 77(12): 1532-1543.
- Vovides, A. P. 2000. México: Segundo lugar mundial en diversidad de cícadas. *Biodiversitas*. 6(31): 6-10.
- Vovides, A. P., D. González, M. A. Pérez F., S. Avendaño, and C. Bárcenas. 2004. A review of research on the cycad genus *Ceratozamia* Brongn. (*Zamiaceae*) in Mexico. *Taxon*. 53 (2): 291–297.
- Whittle, M. W. 2003. *Gait Analysis: an introduction*. Butterworth-Heinemann. Great Britain. 201 p.
- Yagi, F. 2004. Azoxyglycoside content and  $\beta$ -glycosidase activities in leaves of various cycads. *Phytochemistry*. 65: 3243-3247.
- Yañez, E. L. 2006. *Las cycadas Biología y Conservación en México*. Chapingo, Estado de México: Universidad Autónoma Chapingo. pp. 67-120.
- Yañez, E. L., J. Fortanelli M. y E. García Ch. 2009. Proyecto “The Chamal (*Dioon edule* Lindl.) in the state of San Luis Potosí, México”. En prensa.