



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

**“EFECTO GENOTÓXICO DE ALFALFA (*Medicago sativa* L.)
EN LINFOCITOS HUMANOS CON EL ENSAYO COMETA”**

TESIS

PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA

GARCÍA CAMARGO MARIANA

DIRIGIDO POR

DRA. MA. GUADALUPE GARCÍA ALCOCER

SANTIAGO DE QUERÉTARO, QUERÉTARO, 2016



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

**“EFECTO GENOTÓXICO DE ALFALFA (*Medicago sativa* L.)
EN LINFOCITOS HUMANOS CON EL ENSAYO COMETA”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA

MARIANA GARCÍA CAMARGO

DIRIGIDA POR

Dra. MA. GUADALUPE GARCÍA ALCOCER

SINODALES

**Dra. MA. GUADALUPE GARCÍA ALCOCER
DIRECTOR**

**Dra. LAURA CRISTINA BERUMEN SEGURA
SINODAL**

**Dra. JESICA ESTHER ESCOBAR CABRERA
SINODAL**

**QFB SABINA SÁNCHEZ VELEZ
SINODAL**

ÍNDICE GENERAL

CONTENIDO	PÁGINA
ÍNDICE GENERAL	i
ÍNDICE DE CUADROS	iii
ÍNDICE DE FIGURAS	iv
RESUMEN	
1. ANTECEDENTES	1
1.1 <i>Medicago sativa</i> L.	1
1.1a Producción mundial	1
1.1b Usos	2
1.1c Reportes fitoquímicos	3
1.1d Reportes clínicos y farmacológicos	5
1.2 Toxicidad y efectos adversos	9
1.3 Daño al ADN	13
1.4 Ensayo cometa	15
2. HIPÓTESIS	18
3. OBJETIVOS	19
3.1 General	19
3.2 Específicos	19
4. METODOLOGÍA	20
4.1 Materiales	20
4.2 Reactivos	20
4.3 Métodos	21
4.3.1 Preparación de extractos acuosos de alfalfa en polvo	21
4.3.2 Ensayo cometa.	21
4.3.2.1 Preparación de las soluciones	21
4.3.2.2 Obtención de linfocitos de sangre venosa	22
4.3.2.3 Preparación de los microgeles de agarosa	22

4.3.2.4	Lisis celular	23
4.3.2.5	Desnaturalización y electroforesis	23
4.3.2.6	Neutralización y fijación	24
4.3.2.7	Tinción y visualización	24
4.4	Diseño experimental	25
4.4a	Cálculos estadísticos	26
5.	RESULTADOS	27
6.	DISCUSIÓN	42
7.	CONCLUSIÓN	46
8.	REFERENCIAS	47

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Determinación de la genotoxicidad de <i>M. sativa</i> de tres cosechas diferentes.	25
2	Resultados del efecto genotóxico de <i>M. sativa</i> de diferentes cosechas y a distintas concentraciones en linfocitos humanos por un período de exposición de 2 horas.	27
3	Resultados del efecto genotóxico de <i>M. sativa</i> de diferentes cosechas y a diferentes concentraciones en linfocitos humanos por un período de exposición de 24 horas.	28
4	Comparación del promedio de los diferentes grupos experimentales a las 2 horas de incubación contra el control negativo, mediante la prueba de <i>t</i> de <i>Student</i> con $p < 0.05$.	30
5	Comparación del promedio de los diferentes grupos experimentales a las 24 horas de incubación contra el control negativo, mediante la prueba de <i>t</i> de <i>Student</i> con $p < 0.05$.	31
6	Comparación del promedio de los diferentes grupos experimentales a las 2 horas de incubación contra el control positivo, mediante la prueba de <i>t</i> de <i>Student</i> con $p < 0.05$.	32
7	Comparación del promedio de los diferentes grupos experimentales a las 24 horas de incubación contra el control positivo, mediante la prueba de <i>t</i> de <i>Student</i> con $p < 0.05$.	33

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Planta de alfalfa (<i>M. sativa</i>) (Rangel, 1993)	2
2	Cumestrol, componente fitoestrogénico de la alfalfa (<i>M. sativa</i>)	12
3	Daño al ADN causado por exposición a agentes químicos y físicos (Adaptado de Karp, 2010).	15
4	Principio general de la formación de la cola de cometa bajo condiciones alcalinas (Zúñiga, 2009).	16
5	Gráfica representativa del efecto genotóxico de <i>M. sativa</i> de las diferentes cosechas probadas en linfocitos humanos, comparados contra un control positivo de peróxido de hidrógeno 200 μM , un control negativo de PBS 1X y a un período de exposición de 2 horas. * <i>t</i> de Student, $p < 0.05$.	34
6	Gráfica representativa del efecto genotóxico de <i>M. sativa</i> de las diferentes colectas probadas en linfocitos humanos, comparados contra un control positivo de peróxido de hidrógeno 200 μM , un control negativo de PBS 1X y a un período de exposición de 24 horas. * <i>t</i> de Student, $p < 0.05$.	35
7	Efecto de la exposición ante: a) Control positivo: H_2O_2 200 μM , b) Control negativo: PBS 1X; c, d, e y f) <i>M. sativa</i> de la cosecha 1 en diferentes concentraciones; en linfocitos humanos por un período de 2 horas.	36
8	Efecto de la exposición ante: a) Control positivo: H_2O_2 200 μM , b) Control negativo: PBS 1X; c, d, e y f) <i>M. sativa</i> de la cosecha 1 en diferentes concentraciones; en linfocitos humanos por un período de 24 horas.	37
9	Efecto de la exposición ante: a) Control positivo: H_2O_2 200 μM , b) Control negativo: PBS 1X; c, d, e y f) <i>M. sativa</i> de la cosecha	38

	2 en diferentes concentraciones; en linfocitos humanos por un período de 2 horas.	
10	Efecto de la exposición ante: a) Control positivo: H ₂ O ₂ 200 µM, b) Control negativo: PBS 1X; c, d, e y f) <i>M. sativa</i> de la cosecha 2 en diferentes concentraciones; en linfocitos humanos por un período de 24 horas.	39
11	Efecto de la exposición ante: a) Control positivo: H ₂ O ₂ 200 µM, b) Control negativo: PBS 1X; c, d, e y f) <i>M. sativa</i> de la cosecha 3 en diferentes concentraciones; en linfocitos humanos por un período de 2 horas.	40
12	Efecto de la exposición ante: a) Control positivo: H ₂ O ₂ 200 µM, b) Control negativo: PBS 1X; c, d, e y f) <i>M. sativa</i> de la cosecha 3 en diferentes concentraciones; en linfocitos humanos por un período de 24 horas.	41

RESUMEN

La alfalfa (*Medicago sativa* L., "*M. sativa*") es una hierba con un alto contenido nutrimental por lo que es muy utilizada como forraje para ganado vacuno, ovino, porcino, equino y aves de corral; además es ampliamente utilizada en la medicina tradicional para tratar distintos padecimientos ya que, distintas investigaciones han reportado que *M. sativa* reduce las concentraciones de colesterol y de glucosa en sangre, tiene actividad antimicrobiana, ansiolítica, antiinflamatoria, antioxidante, neuroprotectora y hepatoprotectora; pocos estudios han evaluado sus efectos anticancerígenos. Sin embargo, se han reportado efectos tóxicos por su consumo, como la inducción de Lupus Eritematoso Sistémico (LES) atribuido a L-canavanina, componente de la hierba; pancitopenia, y además se ha demostrado que el cumestrol, un componente fitoestrogénico de *M. sativa*, puede ser causante de mutagenicidad. En este estudio se evaluó el efecto genotóxico de *M. sativa* de tres cosechas diferentes mediante el ensayo cometa en su versión alcalina en linfocitos humanos, el cual permite observar el ADN dañado por medio de la formación de una cola de cometa. Se preparó un extracto acuoso de *M. sativa* en polvo en concentraciones de 50, 100, 200 y 400 µg/ml de tres cosechas diferentes y se evaluaron en tiempos de 2 y 24 horas de exposición al extracto. El análisis estadístico se realizó por medio de la prueba de *t* de *Student*, en el cual se comprobó que *M. sativa*, a las concentraciones de 50, 100, 200 y 400 µg/ml no ejerce efecto genotóxico en comparación con el control positivo.

1. ANTECEDENTES

1.1. *Medicago sativa* L.

La alfalfa (*Medicago sativa* L., “*M. sativa*”), es comúnmente conocida como “padre de todas las plantas”; es una especie vegetal de leguminosas herbáceas perennes, una especie de la familia de las *Fabaceae*, originaria de Asia. La planta madura de *M. sativa* se caracteriza por una fuerte raíz principal, la cual llega a medir de 6 m o más de longitud desde la raíz (ya que llega hasta 2 metros de profundidad) y con muchas raíces laterales conectadas a la corona cuando *M. sativa* se cultiva en suelos bien drenados, profundos y húmedos. La corona, una estructura compleja cerca de la superficie del suelo, es responsable del crecimiento vegetal, produciendo brotes que se desarrollan en los tallos. Las hojas tri o multi foliadas de forma alterna en el tallo, y tallos secundarios y terciarios puede desarrollarse a partir de las axilas de las hojas. Una planta en un campo de producción de forraje típico tiene entre 5 y 15; las flores varían en color púrpura, amarillo y crema las más comunes (Figura 1). Después de la polinización, las flores comúnmente producen vainas de semillas en forma de espiral (Lemus y col., 2003).

Debido a que su raíz se introduce en la tierra a gran profundidad, puede alcanzar muchos nutrientes y soportar sequías extremas. La temperatura ambiental es un factor de suma importancia para su adecuado desarrollo. La semilla puede germinar desde una temperatura de 2 o 3°C, pero si es más alta, la germinación es más rápida. La óptima va de 28 a 30°C. Por otro lado, si la temperatura es excesivamente cálida, superior a los 38°C, las plantas mueren (Juan y col., 1995).

1.1a. Producción mundial:

M. sativa es la leguminosa más cultivada en el mundo, en México se calculan producciones anuales de alrededor de los 69 millones de toneladas. Canadá controla la mayor parte del mercado (85%) de producción y exportación de *M. sativa* en el mundo; en este rubro, también participan países como Francia, Italia, España, Holanda, México, Corea, Australia, entre otros. Japón y Estados Unidos dependen en una parte en la importación de productos de *M. sativa*, México es el segundo país

importador de productos de alfalfa a Estados Unidos, con una participación promedio del 11%, ya que por la cercanía entre los países, la logística se vuelve menos compleja y el transporte más eficiente (SAGARPA, 2009).



Figura 1. Planta de alfalfa (*M. sativa*) (Rangel, 1993).

La época de la siembra varía según la región geográfica. *M. sativa* puede sembrarse en el ciclo otoño-invierno. En las regiones que tienen inviernos muy fríos se hacen siembras de primavera, aunque el momento óptimo es al terminar el verano o comenzando el invierno, a fin de conseguir la germinación de las semillas antes de las heladas. *M. sativa* se corta o se cosecha durante el verano cuando el alfalfar presenta una floración de diez a 15 por ciento. En invierno se realiza cuando alcanza una altura de 35 centímetros (Juan y col., 1995).

1.1b. Usos:

M. sativa es una hierba que se utiliza sobre todo como forraje, verde o seca, para el ganado vacuno, ovino, porcino, equino y aves de corral. Por su valor nutritivo,

también tiene cabida en la cocina familiar. Sus brotes tiernos se usan en ensaladas y para preparar agua de sabor. Adicionalmente, la *M. sativa* es usada en la medicina tradicional para reducir la pérdida de memoria (Singh y Sharma, 2011), para problemas de dolor de riñón, tos, dolores musculares, como rejuvenecedor, antidiabético (Swanston y col., 1990), antioxidante (Cie la y col., 2012), antiinflamatorio (Ki-Choon y col., 2013), antifúngico (Houghton y col., 2006), antimicrobiano (Avato y col., 2006), diurético y en desórdenes del Sistema nervioso central (Singh y Sharma, 2012).

M. sativa ha sido utilizada en China desde el siglo VI para tratar cálculos renales, fiebre, disuria, para aliviar la retención de líquidos e hinchazón. Los nativos americanos usaban *M. sativa* para tratar artritis, forúnculos, cáncer, escorbuto y problemas urinarios. En México se emplea como complemento alimenticio y también por sus propiedades curativas en diversos problemas del aparato digestivo (dolor estomacal), respiratorio (tos), sistema renal-urinario (dolor renal), nervioso (para los nervios) y músculo-esquelético (dolores musculares e inflamación) (Suárez, 1990).

1.1c. Reportes fitoquímicos:

M. sativa contiene una gran variedad de fitoquímicos, se han reportado los siguientes:

- Alcaloides: trigonelina, estaquidrina, L- homoestaquidrina. Aminoácidos: lisina, arginina, tirosina, histidina, fenilalanina, metionina, ácido aspártico, ácido glutámico, asparagina, serina, alanina y treonina. Cumarinas: mirsellinol, escopoletina, esculetina, ácido 4- cumárico (Caunni, 2012).
- Carotenos: Zeaxantina, luteína, criptoxantina (Gaweł, 2012).
- Enzimas: isoflavona reductasa, vestitona reductasa, iminopeptidasa, 2- aminopeptidasas (Shao y col, 2007), ferritina, proteína fosfatasa 2^a holoenzima A y - amilasa (Singh y Sharma, 2011).
- Flavonoides: quercetina, luteolina (y tres de sus glucósidos), apigenina (y 6 de sus glucósidos), chrysoeriol, 7-O- -D-glucuronopiranosido apigenina, 4'-O- -D-

glucuronopiranosido apigenina, 7-O-[β -D-glucuronopiranosil(1 \rightarrow 2)-O- β -D-glucuronopiranosido]apigenina, 7-O- β -D-glucuronopiranosido lutenolina y medicarpina, cumestrol, genisteína, daidzeína, y formononetina (Stochmal, 2001 y Cie la, 2012).

- Vitaminas y Minerales: A, B₁, B₆, B₁₂, C, D, E, K, niacina, ácido pantoténico, biotina, ácido fólico, Ca, K, P, Mg, Fe, Zn, Cu, Al, B, Cr, Co, Mn, Mo, Se, Si, Na, Sn. Ácidos orgánicos: citrato, malato, malonato, succinato, fumarato, lactato, benzoato (Gaweł, 2012).
- Aminoácidos no protéicos: L- canavanina (Malinow, 1981).
- Fitoestrógenos: Cumestrol (Price y Fenwick, 1985).
- Compuestos fenólicos: ácido *p*- hidroxibenzóico, ácido vanilínico, ácidos ferúlicos, ácido salicílico, ácido sinapico, ácido cafeíco, hesperetina, naringenina, ácido clorogénico, ácido tánico, heterósidos (Caunni, 2012).
- Poliaminas: noespermidina, noespermina (Caunni, 2012).
- Saponinas: soyasapogenol A, B y E; ácido medicagénico, bayogenina, hederagenina, soyasapogenina I, formomenetina y ácido zahnico, ácido 3-Glc-Glc-Rha-28Glc-medicagénico, ácido 3-Glc-28-Glc-medicagénico, ácido 3-Glc-malonil-28-Glc-medicagénico, Ara- Glc-Ara-hederagenina, 3-Glc-Ara-28-Glc hederagenina, hexa-hexa-bayogenina, ácido 3-Glc-Glc-medicagénico, 3-Rha- Gal-Glc-soyasapongenol B (soyasapogenol I), 3-Glc-Ara-28-Glc-hederagenina, ácido 3-Glc-medicagénico, ácido 3-Glc-malonil-medicagénico, Rha-Gal-GlcA soyasapogenol E, Rha-hex-hex soyasapogenol E, Ara-hex-hederagenina, pen-hederagenina, soyasapogenol A, soyasapogenol B, soyasapogenol E, bayogenina glicósido entre otros (Sen y col., 1998).
- Esteroles y compuestos volátiles: β -espinasterol, dihidroespinasterol, 24-metilcolest-7-enol, campesterol, terpenos, limoneno, linalol, trans-O-cimeno, furanoides, nonadienal, 2-metil-4-penteno, benzaldehído, acetato de benzaldehído, alcoholes: butanol, hexanol, octanol, pentan-3-ol, 3-metil butanol, trans-2 pentenol, trans-2-hexenol, trans-3-hexenol, pent-1-en-3-ol, octa-1,5-dien-3-ol, bencil alcohol, 2-feniletanol; cetonas: pent-1-en-3-ona, pentan-3-ona, octan-3-ona, metilfenil cetona;

ésteres: acetato de trans-3- hexenilo, butanoato de trans-3-hexenilo; aldehídos: hexanal, trans-2-pentanal, trans-2-hexenal, trans-2-noneal, trans-2,4-hexadienal, furano-2-acetato (Singh y Sharma, 2011).

1.1d. Reportes clínicos y farmacológicos:

Se ha reportado que *M. sativa* reduce la absorción del colesterol y formación de la placa aterosclerótica en animales (Wilcox y Galloway, 1961), corroborando esta propiedad en cultivos de *M. sativa* libres de cumestrol y L-canavanina y posteriormente determinaron que, en conejos hipercolesterolémicos, por medio de tratamiento con extracto alcohólico de *M. sativa*, se produjo una reducción de la concentración plasmática de colesterol total y de la lipoproteína de baja densidad y que posee una fuerte actividad antiaterosclerótica (Khaleel y col., 2005). Así como las saponinas contenidas en *M. sativa* disminuyen las concentraciones plasmáticas del colesterol, sin cambiar las concentraciones de la lipoproteína de alta densidad, disminuye la absorción intestinal del colesterol, incrementando la excreción de esteroides neutros y ácidos biliares, previene e induce la regresión de aterosclerosis (Malinow y col., 1977).

Presenta actividad antimicrobiana en bacterias Gram positivas y Gram negativas aunque la actividad fue especialmente alta contra bacterias Gram positivas (*Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* y *Enterococcus faecalis*) que fueron las empleadas en el ensayo y antifúngica en *Saccharomyces cerevisiae* y *Candida albicans* (Avato y col., 2006), antihelmínticas contra *Xiphinema index* (D'Addabbo y col., 2009).

Se ha reportado también que las infusiones de *M. sativa* reducen los niveles de hiperglicemia en la diabetes inducida por estreptozotocina; el extracto acuoso estimula el transporte de 2-desoxi-D-glucosa, la oxidación de la glucosa y la incorporación de la glucosa en glucógeno en músculo abdominal del ratón. En administración aguda estimula la secreción de insulina por BRIN-BD11, línea celular - pancreática (Mohamed y col., 2006). La relación con la actividad secretora de la

insulina en *M. sativa* es por efecto de más de un constituyente; el manganeso es reportado como el principal responsable de los efectos hipoglucémicos en *M. sativa* (Swanston y col., 1990).

Se evaluó el potencial antiinflamatorio de *M. sativa* y los mecanismos involucrados mediante la preparación de una serie de extractos a partir de un extracto metanólico, cuyos disolventes usados fueron éter de petróleo, cloroformo, n-butanol y agua destilada; se administró 1 µg/ml de lipopolisacáridos estimulantes de la respuesta inmune, con lo cual se incrementaron las concentraciones de nitrito en macrófagos RAW267.4, pero usando el extracto clorofórmico se redujeron los niveles significativamente, disminuyeron los niveles de Factor de Necrosis Tumoral alfa e interleucinas IL-6 e IL-1b, y además aumentó la supervivencia de los ratones después de 48 horas del tratamiento con lipopolisacáridos. Las subfracciones del extracto clorofórmico suprimen la activación de la señal de la quinasa extracelular regulada por lipopolisacáridos y el Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas, además inhibe la producción de Óxido nítrico y la secreción de citoquinas proinflamatorias en células macrófagos; se encontró que los derivados del ácido cinámico y ácidos grasos son los componentes activos del extracto, demostrándose su actividad antiinflamatoria (Ki-Choon y col., 2013).

M. sativa también presenta actividad antidermatofíticas contra tres tipos de hongos dermatofíticos: *Microsporum gypseum*, *Trichophyton interdigitale* y *Trichophyton tonsurans*, por medio del ensayo de dilución en placas de microwell para determinar la Concentración Mínima Inhibitoria; para el ensayo se utilizó el extracto crudo de la planta y las saponinas aisladas y previamente identificadas, en concentraciones de 4 mg/ml a 0.0625 mg/ml, en medio Sabouraud dextrosa se inoculó el equivalente a 10^4 UFC/ml en 30°C por 24 horas y el crecimiento del hongo se comenzó a observar a 120 horas después de la incubación, se utilizó como control positivo miconazol. Como resultado, se observó que *T. tonsurans* era más sensible a los extractos y que los glucósidos monodesmosídicos de ácido medicagénico eran los más activos (Houghton y col., 2006).

Además *M. sativa* exhibe un efecto neuroprotector y una mejor defensa antioxidante contra la isquemia y la lesión cerebral inducida por reperfusión en ratón. Se empleó como metodología la oclusión de la arteria carótida bilateral produciendo un infarto cerebral, además se determinó la actividad de la xantina oxidasa, la producción de anión superóxido, el agotamiento del glutatión reducido y la actividad de la superóxido dismutasa, con esto se determinó un estándar de daño y además se observó un deterioro de la memoria a corto plazo y la coordinación motora. En otro grupo se realizó un pre-tratamiento con extracto metanólico de *M. sativa* a concentraciones de 100 y 200 mg/Kg, posteriormente se produjo la isquemia cerebral. Como resultado, se logró determinar que en los ratones tratados con *M. sativa* se redujo el tamaño del infarto cerebral, así como los niveles de anión superóxido, de xantina oxidasa, la restauración significativa de los niveles de glutatión reducido, superóxido dismutasa y el deterioro atenuado de la memoria a corto plazo y la coordinación motora; este efecto se debe a la actividad antioxidante y como consecuencia, la inhibición en la formación de ROS (especies reactivas de oxígeno) (Singh y Sharma, 2010).

Además se ha evaluado el efecto hepatoprotector de *M. sativa* en intoxicaciones por Tetracloruro de carbono en ratas. El extracto de *M. sativa* se evaluó en ratones tipo Winstar y se cuantificaron los niveles de transaminasas séricas, fosfatasa alcalina, bilirrubinas, perfil lipídico, proteínas totales, así como el efecto sobre el malonilaldehído, un producto final de la peroxidación lipídica, y la actividad antioxidante por la determinación de grupos sulfhidrilo no protéicos en hígado. El estado antioxidante en el hígado asociado a los niveles de grupos sulfhidrilo no protéicos y el contenido de proteínas totales se redujeron en los animales tratados sólo con Tetracloruro de carbono. En el pretratamiento con *M. sativa* y silimarina durante tres semanas antes de la administración de Tetracloruro de carbono se previno de manera significativa el aumento de los niveles séricos de los marcadores hepáticos. Un examen histopatológico de los hígados de las ratas mostró que el extracto de alfalfa redujo la incidencia de las lesiones inducidas por Tetracloruro de carbono. La evaluación antioxidante *in vitro* del extracto de *M. sativa* por el ensayo

del 2,2-difenil-1-picril hidrazilo y ensayos caroteno-linoleico demostró un potencial antioxidante moderado. Los resultados sugieren que el extracto de alfalfa posee propiedades hepatoprotectoras y antioxidantes contra el estrés oxidativo, posiblemente, a través de sus constituyentes (Al-Dosari, 2012).

Para comprobar la veracidad del uso tradicional como ansiolítico de *M. sativa*, se realizó un estudio usando las partes aéreas de esta planta extraídas con éter de petróleo (60- 80°C), cloroformo, metanol y agua destilada. Todos los extractos crudos fueron evaluados para la actividad anti-ansiedad en ratones utilizando el aparato de laberinto elevado, se utilizó el diazepam como fármaco estándar. Como resultado, de todos los extractos evaluados, sólo el extracto metanólico mostró actividad significativa ($p < 0.05$) al aumentar el tiempo medio de permanencia, y el número de entradas en los brazos abiertos a una dosis de 100 mg/ Kg en ratones con respecto al vehículo control tratado así como el estándar (2 mg/Kg), demostrando así que *M. sativa* ejerce un efecto ansiolítico en ratones, y podría servir con un nuevo enfoque para el tratamiento de la ansiedad (Singh y Sharma, 2012).

Sin embargo, sólo unos pocos estudios han informado de sus efectos anticancerosos. En un estudio realizado con extractos obtenidos a partir de hojas de *M. sativa* y acetona, a su vez fraccionados con tolueno, acetato de etilo, n-butanol y metil terc-butil éter; sus efectos citotóxicos se evaluaron en varias líneas de células tumorales sensibles y resistentes a múltiples fármacos. Usando la línea celular de leucemia de ratón P388 y su contraparte doxorubicina resistentes (P388/DOX), se demostró que la inhibición del crecimiento celular inducido por extractos de hojas de *M. sativa* fue mediada a través de la inducción de la apoptosis, como se evidencia por el análisis de la fragmentación del ADN (Ácido Desoxirribonucleico). La ejecución de la muerte celular programada se logró a través de la activación de caspasa-3, lo que lleva a la escisión de la enzima poli ADP ribosa polimerasa. El fraccionamiento de extracto de tolueno, el extracto más activo obtenido a partir de extracto crudo, condujo a la identificación de 3 derivados de terpeno y 5 flavonoides. Entre ellos, (-)-Medicarpina, (-)-melilotocarpan E, millepurpan, Tricina, y chrysoeriol, que mostraron efectos citotóxicos en P388 así como en células P388/DOX. Estos resultados

demuestran que el extracto de hoja de alfalfa puede tener un interesante potencial en la prevención o terapia del cáncer (Gatouillat y col., 2014).

1.2. Toxicidad y efectos adversos:

Se ha reportado que tanto las semillas, como la hierba de *M. sativa* inducen Lupus Eritematoso Sistémico. El estudio se realizó con diez primates hembra de edad adulta, las cuales fueron asignadas al azar a dos grupos: 1) Grupo con dieta isocalórica que contenía caseína, sucrosa, mantequilla, vitaminas, sales y 0.34 mg de colesterol por caloría, con 23% de las calorías proporcionadas por proteínas, 34% por carbohidratos y 43% por grasas, este grupo sirvió como control; y 2) Grupo con dieta isocalórica y 45% de semillas de alfalfa molida. Ambos grupos fueron estudiados en intervalos mensuales después de 5 meses en sus respectivas dietas. Los animales control tenían una media de hematocrito de $43 \pm 2\%$; los resultados de las pruebas de antiglobulina, anticuerpos antinucleares y presencia de células LE fueron negativo. Los valores promedio de C3 y C4 fueron 309 ± 47 mg/dl y 35 ± 7 mg/dl respectivamente. Los niveles promedio de anti-ADN de doble cadena fue de $1,9 \pm 0,2\%$ en suero. En el grupo dos, tres de los cinco animales alimentados con semillas de alfalfa desarrollaron signos de una enfermedad similar al Lupus Eritematoso Sistémico, caracterizada por anemia aguda (Hematocrito 30% más bajo), Anticuerpos antinucleares positivo (título mayor a 1:15, 1:360 como patrón límite) y niveles elevados de anti-ADN de doble cadena (96%) con grados variables de hipocomplementemia (Bardana y col., 1982).

Después de once meses de la exposición inicial a las semillas de alfalfa, los animales estaban moribundos y tuvieron que ser sacrificados para la realización de una necropsia. La necropsia reveló hiperqueratosis de la piel del antebrazo, cadera, y el cuero cabelludo con taponamiento queratósico de los folículos pilosos, la desaparición de glándulas sebáceas, inflamación dérmica crónica, y colonización bacteriana focalizada con ulceración y dermatitis purulenta aguda. Hubo peritonitis aguda con un gran número de bacilos gram negativos y cocos gram positivo.

También se observó una tiroiditis crónica severa. No se observó daños renales ni arteriales. (Bardana y col., 1982).

Esto se atribuye a la L-canavanina, un constituyente no proteico de *M. sativa* que trabaja como un potente antagonista que exhibe una actividad antimetabólica en muchos sistemas vivos *in vivo* e *in vitro*. La L- canavanina puede competir con L- arginina en muchas enzimas como la arginil-tRNA- sintetasa, la óxido nítrico sintetasa inducible (iNOS) y Arginasa. Lo más importante, la L- canavanina es un sustrato para la enzima arginil-tRNA sintetasa y así reemplazar a la L-arginina durante la síntesis de proteínas; L- canavanina se puede incorporar de manera más eficiente en la presencia de un proceso inflamatorio u otra condición que pueda causar deficiencia de arginina (Akaogi y col., 2006). Otro mecanismo planteado es que, L- Canavanina se escinde hidrolíticamente por la arginasa para producir canalina y urea. Los estudios han demostrado que canalina tiene propiedades de antimetabolito, que se cree resulta de su capacidad para unirse con fosfato de piridoxina haciendo que el resto de las enzimas dependientes de vitamina B₆ empleen este cofactor inactivo (Bardana y col., 1982). Es posible que el resto ejerza un efecto tóxico sobre el sistema de degradación de ADN, mediada por una enzima homeostática que resulta en complejos de ADN-anti-ADN (Alcocer y col., 1985). Se ha reportado que las semillas de *M. sativa* contienen cantidades sustanciales de canavanina (80- 150 mg/Kg), en cambio, en las hojas se reportan cantidades de 0.9- 1.2 mg/g (Gaweł, 2012).

Lupus Eritematoso Sistémico (LES) es una enfermedad autoinmune caracterizada por anemia, bajos niveles de componentes del complemento en el suero, anticuerpos a ADN y una deposición de inmunoglobulinas y complementos en la piel y riñones. La evidencia disponible sugiere que LES en los humanos es de etiología multifactorial. Anormalidades serológicas incluyen complemento deprimido, anticuerpos a constituyentes nucleares, leucocitos y eritrocitos. Los factores genéticos, virales e inmunológicos han sido implicados en su causalidad. Algunos de estos factores pueden ser necesarios, pero no suficientes por sí mismos para la expresión de la enfermedad. LES inducido por fármacos es poco frecuente, pues

ocurre 10 veces con menos frecuencia que LES idiopático, y que difieren entre sí por la baja incidencia de afectación renal y del sistema nervioso central, la presencia de anticuerpos contra ADN de doble cadena, y la alta incidencia de anticuerpos anti histonas (Alcocer y col., 1985).

El consumo de las semillas de *M. sativa* causa pancitopenia en humanos. Un hombre aparentemente sano de 59 años de edad, como participante de un estudio para reducir las concentraciones de colesterol plasmático por el consumo de semillas de *M. sativa*, ingirió de 80-160 g de semillas molidas al día, en ocho ocasiones, distribuidos en períodos de seis semanas por 5 meses; la concentración de su colesterol plasmático se redujo, no se presentaron complicaciones ni síntomas durante el estudio, excepto flatulencias durante la ingestión de las semillas. Análisis clínicos de rutina al final del período de observación, revelaron anemia y leucopenia, cinco meses antes los valores habían sido normales; un examen físico reveló esplenomegalia, la prueba de Coombs directa e indirecta reveló unión de Inmunoglobulina G y se detectaron anticuerpos antinucleares eritrocitarios. Un examen de rayos X de tórax mostró pequeños nódulos calcificados compatibles con la exposición al bacilo de tuberculosis. Cuando las semillas de *M. sativa* ya no fueron ingeridas, el bazo se redujo a la normalidad, los estudios serológicos y complementarios volvieron a ser negativos y los valores hematológicos regresaron lentamente a la normalidad; el paciente permaneció sin síntomas y continuó llevando una vida normal. Aunque este caso sugiere que la pancitopenia ocurre cuando se ingieren cantidades relativamente grandes de semillas de *M. sativa*, queda por determinar si las anomalías similares se producen cuando se consumen cantidades más pequeñas de las semillas (Malinow y col., 1981).

Por otra parte, se ha reportado que el Cumestrol (Figura 2), un fitoestrógeno que se encuentra en altos niveles en *M. sativa* y el trébol rojo, produce trastornos endocrinos en los animales de granja expuestos a altos niveles de fitoestrógenos. Estudios anteriores encontraron que cumestrol induce rompimiento de la cadena de ADN, provoca la formación de micronúcleos, y mutaciones en el gen de la hipoxantina

fosforribosil transferasa (HPRT) de las células de ovario del hámster chino (Kulling y Metzler, 1997).

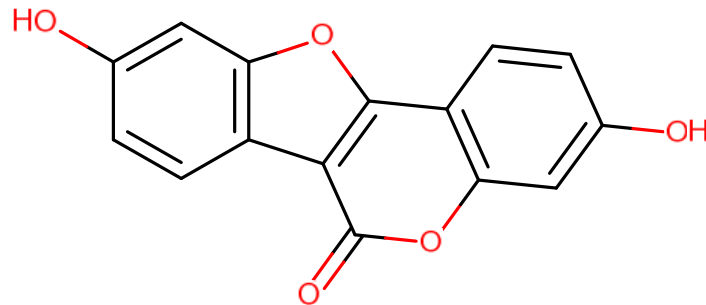


Figura 2. Coumestrol, componente fitoestrogénico de la alfalfa (*M. sativa*)

Se realizaron estudios para evaluar el efecto de la exposición a coumestrol en células linfoblásticas humanas AHH-1 TK^{+/-}. Los micronúcleos fueron inducidos con la frecuencia más alta que ocurre en el día 2 después de la exposición. Análisis de citometría de flujo de células teñidas con anexina V-FITC-7-aminoactinomicina D indicaron que la principal vía de la muerte celular era por apoptosis. Las mutaciones se indujeron en el gen de la timidina quinasa (TK) y se debieron principalmente a la inducción de clones con el fenotipo de crecimiento lento. Un análisis molecular posterior reveló la pérdida del exón 4 en los clones con exposición al coumestrol, indicativo de pérdida de heterocigosidad y de conformidad con una propuesta de la inhibición de la actividad de la topoisomerasa-II como un mecanismo de acción para coumestrol. En conjunto, estos resultados sugieren que a las exposiciones a coumestrol se presentan ambas propiedades mutagénicas y clastogénicas en las células linfoblásticas humanas cultivadas (Domon y col., 2001).

Además se han reportado estudios de mutagenicidad con la prueba de Ames, utilizando cepas de ensayo TA98 y TA100 en presencia y ausencia de microsomas hepáticos de rata. Se probó un extracto cetónico de *M. sativa*, sin embargo, los resultados obtenidos para esta planta fueron negativos (White y col., 1985).

Hasta este punto de la investigación sobre *M. sativa*, no se tienen reportados estudios realizados sobre efectos de genotoxicidad en animales o humanos, por lo que es de vital importancia conocer si se puede ingerir de manera segura, a pesar del contenido de compuestos químicos reportados como causantes de daño a la salud y que se encuentran en esta planta.

1.3. Daño al ADN

La integridad de nuestro ADN es un aspecto fundamental para la salud y buen funcionamiento del organismo, sin embargo, sabemos que el material genético es susceptible a ser dañado por numerosos agentes o procesos, por ejemplo, la guanina es especialmente susceptible a las especies reactivas de oxígeno producidas durante el metabolismo natural de las células; por lo que se sabe que en el cuerpo humano diariamente se producen más de 10,000 puntos de oxidación en el ADN por célula y además se han encontrado 35 diferentes formas de bases oxidadas en el ADN de manera *in vitro*. Aunque la mayoría del daño que se produce en el material genético es reparado eficientemente por las enzimas de reparación de ADN, parte de él escapa a este proceso y además se acumula con la edad, por lo que estas lesiones no reparadas o mal reparadas pueden afectar diversos mecanismos, tales como el control del ciclo celular, la expresión génica, la comunicación citoplasma-mitocondria, constituyendo un potencial proceso de desarrollo de carcinogénesis (Karp, 2010)

La genotoxicidad es una propiedad que poseen ciertos agentes y que se caracteriza por afectar a la integridad del genoma de los seres vivos. Un agente genotóxico es aquel compuesto de naturaleza química o física capaz de inducir, directa o indirectamente, alteraciones en el material genético de los seres vivos con el consiguiente bloqueo de la replicación, así como la aparición de mutaciones que derivan en patologías y/o cambios en las características de dichos organismos (Mauriz y Martínez, 2014).

Si se acepta que el daño en el ADN es perjudicial, la prevención del mismo o el incremento en la eficiencia en reparación, cabe considerarlos como beneficiosos, por

lo que es de suma importancia, contar con herramientas sensibles y fiables que nos permitan profundizar en los aspectos relacionados con la detección del daño en el ADN, así como con su protección y reparación (Zúñiga, 2009).

Cuando el ADN se afecta por radiación ionizante, el esqueleto de la molécula sufre con frecuencia roturas; cuando se expone a ciertos reactivos químicos, algunos de los cuales se generan por el metabolismo de la célula misma, las bases de una molécula de ADN pueden alterarse de manera estructural; cuando se somete a radiación del tipo ultravioleta, las pirimidinas adyacentes en las cadenas de ADN tienden a interactuar entre sí para formar complejos covalentes y crear un dímero. De igual forma, la absorción de energía térmica producida por el metabolismo, es suficiente para eliminar las bases de adenina y guanina de su unión a los azúcares en el esqueleto de ADN (Figura 3). La magnitud de estas alteraciones espontáneas o lesiones, pueden reconocerse, si se considera que cada célula de un mamífero de sangre caliente, pierde alrededor de 10 000 bases por día. La falla para reparar estas lesiones produce anomalías permanentes, o mutaciones, en el ADN. Si la mutación tiene lugar en una célula destinada a ser un gameto, la alteración genética puede pasar de una generación a la próxima. Las mutaciones también tienen efectos en las células somáticas (por ejemplo, en células que no pertenecen a la línea germinal): pueden interferir en la transcripción y la replicación, lo que causa la transformación maligna de una célula o acelera el proceso por medio del cual un organismo envejece (Karp, 2010).



Figura 3. Daño al ADN causado por exposición a agentes químicos y físicos (Adaptado de Karp, 2010).

1.4. Ensayo cometa

Es un método para medir el daño al ADN en las células humanas como linfocitos, obtenidos en el curso de los estudios basados en la población en exposición ambiental y ocupacional a los diferentes agentes genotóxicos, incluyendo radiación, productos químicos y estrés oxidativo. Las células se incrustan en una capa delgada de agarosa, sobre un portaobjetos de vidrio o película de plástico, luego se lisan con una solución detergente y NaCl 2.5 M, las membranas y constituyentes celulares solubles, así como las histonas, se retirarán, dejando al ADN superenrollado unido a la matriz nuclear. La incubación alcalina subsecuente y la electroforesis hacen que los bucles de ADN que contienen rupturas se muevan hacia el ánodo formando una “cola de cometa” cuando se visualiza por microscopio de fluorescencia (Figura 4). El

contenido relativo de ADN en la cola indica la frecuencia de las rupturas (Zúñiga, 2009).

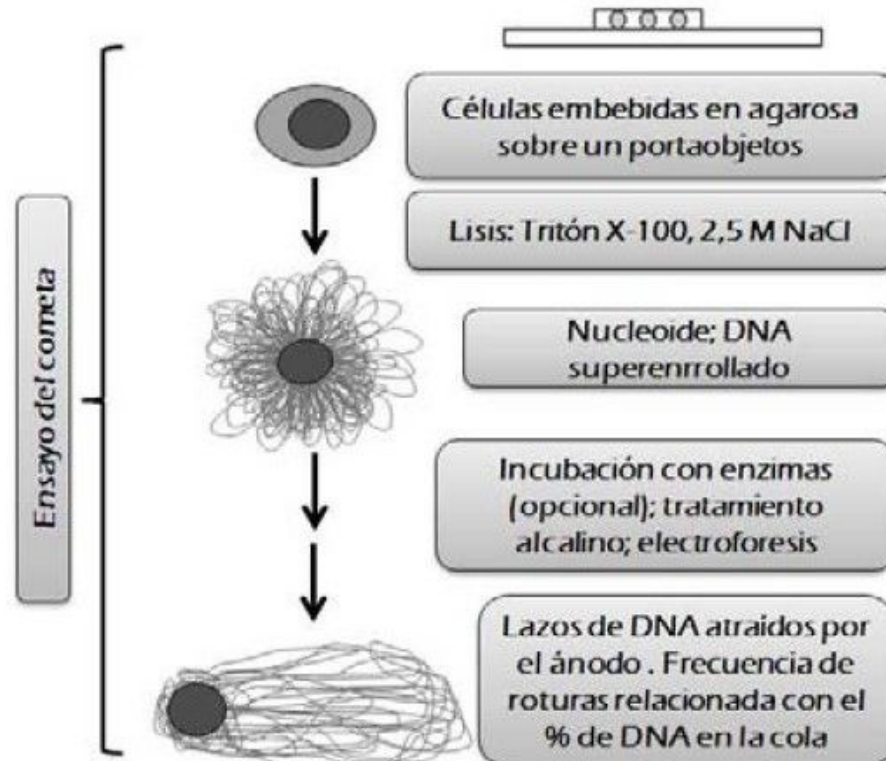


Figura 4. Principio general de la formación de la cola de cometa bajo condiciones alcalinas (Zúñiga, 2009).

En la incorporación de un paso adicional en una etapa temprana del ensayo, al adicionar digestión con una endonucleasa específica de la lesión después de la lisis, permite la detección cuantitativa de bases dañadas; más comúnmente, las bases oxidadas. El ensayo cometa tiene aplicación en áreas de las ciencias biomédicas y de salud ambiental, tales como la vigilancia biológica de las poblaciones humanas para la exposición ocupacional/ambiental a agentes genotóxicos, la evaluación de daños en el ADN y el estrés oxidativo en relación con diversas enfermedades y la evaluación de la protección antioxidante ofrecida por micronutrientes en la dieta humana (Dusinska y Collins, 2008).

En la evaluación de riesgos, el ensayo cometa puede ayudar en la identificación de peligros. El daño del ADN también es comúnmente considerado como un marcador de riesgo de cáncer. Está claro que es relevante para el cáncer ya que el daño del ADN es suceso iniciador en la carcinogénesis, pero hasta ahora no hay evidencia de que un alto nivel de daño en el ADN, medido en las células blancas de la sangre (la muestra normal en humanos) refleje un riesgo elevado de cáncer. En contraste, se ha demostrado que tiene valor predictivo de aberraciones cromosómicas y micronúcleos (Azqueta y col., 2014).

La versión alcalina del ensayo detecta roturas de cadena simple y doble del ADN, pero las roturas de cadena simple no son las más interesantes, ya que son fácilmente reparadas y no son consideradas como lesiones significativamente letales o mutagénicas. Muchos agentes mutagénicos no introducen roturas directamente, pero pueden producir sitiosapurínicos/apirimídicos, los cuales son alcalinos lábiles y probablemente se rompen mientras el ADN es sometido a la electroforesis a pH alto. Además, otras lesiones pueden estar presentes transitoriamente durante la reparación celular por escisión de bases y, por lo tanto, un alto nivel de roturas pueden indicar un gran daño o una deficiente reparación. De hecho, se puede obtener mucha información útil mediante la exploración de la reparación celular que produce roturas del ADN y así revelar o amplificar los efectos de las genotoxinas que, de otra manera, podrían no mostrar efectos positivos en el ensayo cometa (Zúñiga, 2009).

2. HIPÓTESIS

La alfalfa (*Medicago sativa*) no ejerce genotoxicidad en el ADN de linfocitos humanos.

3. OBJETIVOS

3.1 General:

- Evaluar la genotoxicidad de *M. sativa* en linfocitos humanos en un modelo *in vitro* por el ensayo cometa en su versión alcalina.

3.2 Específicos:

- Plantear las concentraciones utilizadas y los diferentes tiempos de incubación de los linfocitos humanos para la evaluación de la genotoxicidad del extracto acuoso de *M. sativa* en polvo.
- Evaluar la posible genotoxicidad *in vitro* *M. sativa* en linfocitos humanos con la metodología del ensayo cometa en su versión alcalina; en concentraciones de 50, 100, 200 y 400 µg/mL a 2 y 24 horas.
- Comparar el daño al ADN desarrollado por *M. sativa* en las diferentes concentraciones evaluadas en los linfocitos humanos, contra un control negativo de PBS 1X y control positivo de H₂O₂ 200 µM con la prueba estadística de *t* de *student*.

4. METODOLOGÍA

4.1 Materiales:

- Sangre periférica
- Jeringa de 5 mL
- Aguja Vacutainer
- Tubo de ensaye con EDTA de 5 ml
- Camisa para aguja vacutainer
- Ligadura
- Torundas con alcohol
- Tubos Falcon de 15 mL
- Pipetas de plástico de 5 mL
- Pipetas pasteur
- Tubos eppendorf
- Portaobjetos rectangulares
- Cubreobjetos rectangulares
- Vasos de precipitados de 50 mL
- Vaso de precipitados de 600 mL
- Probeta graduada de 50 mL
- Pipeta graduada de 5 mL
- Pipeta graduada de 1 mL
- Probeta graduada de 500 mL
- Frascos ámbar 150 mL
- Cámaras de electroforesis horizontales.
- Fuente de poder
- Potenciómetro de pH
- Microscopio modelo AxioSkop 2 Plus con cámara marca Carl Zeiss.
- Lámpara de fluorescencia.
- Balanza analítica

4.2 Reactivos:

- Reactivo de Ficoll Histopaque
- PBS 1X.
- Gel de agarosa de punto de fusión normal (PFN) al 1%
- Gel de agarosa de bajo punto de fusión (BPF) al 0.5%
- NaOH 2N
- HCl 2N
- Buffer de lisis pH= 10
- Buffer de electroforesis pH= 13
- Buffer de neutralización pH= 7.5
- Bromuro de etidio 1 $\mu\text{m}/\text{ml}$

4.3 Métodos:

4.3.1 Preparación de Extractos.

Se prepararon extractos acuosos de *M. sativa* en polvo de tres cosechas diferentes en concentraciones de 50, 100, 200 y 400 µg/mL, pesando las cantidades necesarias en una balanza analítica, mezclando con agua destilada y dejando en maceración por tres días para extraer la mayor cantidad de componentes solubles, puesto a que la alfalfa en polvo no se puede disolver en el agua.

4.3.2 Ensayo cometa.

En su versión estándar el ensayo cometa se lleva a cabo en condiciones alcalinas, de acuerdo con el método inicialmente descrito por Singh y col., 1988, con ligeras modificaciones implementadas por Becerra-Becerra, 2014. Se compone de diversas etapas descritas a continuación.

4.3.2.1 Preparación de soluciones

- Buffer de lisis: Para la preparación de 50 mL de esta solución se emplearon 7.305 g NaCl, 0.06 Tris Base, 0.4g NaOH, 1.86 g EDTA, 5 mL Dimetilsulfoxido (DMSO), 0.5 mL Triton 100x. Se disolvió el NaCl en 25 mL de agua destilada, posteriormente se le adicionó el Tris, el EDTA y al último en NaOH, los sólidos se disolvieron completamente, posteriormente, se le agregó el DMSO y el Tritón 100x, se aforó a 50 mL con agua destilada y se ajustó el pH a 10 (Becerra, 2014).

NOTA: La finalidad de la DMSO en la solución de lisis es eliminar los radicales generados por el hierro liberado de la hemoglobina cuando se utiliza sangre o tejidos de animales.

- Buffer de electroforesis: se pesaron 6 g de NaOH los cuales se disolvieron en un 50 mL de agua, se le adicionó 0.185 g de EDTA, se aforó a 500 mL con agua destilada y se ajustó el pH a 13.
- Buffer neutralizador: se pesaron 12.12 g de Tris-HCl y se disolvieron en 200 mL de agua destilada, el pH final fue de 7.5.

4.3.2.2 Obtención de linfocitos de sangre venosa.

La extracción de los linfocitos se realizó de acuerdo a los requerimientos de la NORMA Oficial Mexicana NOM-012-SSA3-2012, que establece los criterios para la ejecución de proyectos de investigación para la salud en seres humanos (Becerra-Becerra, 2014). Las muestras se obtuvieron de pacientes sanos, no fumadores, de la edad de 20- 23 años, sin antecedentes de enfermedades crónico- degenerativas o infecto-contagiosas, de los cuales se contó con el consentimiento informado.

La muestra de sangre se obtuvo en tubo con EDTA, se mezcló cuidadosamente y posteriormente se vertió en un tubo Falcon de 12 mL para mezclar 1:1 con PBS 1X.

En otro tubo Falcon de 12 mL se adicionaron 3 mL de reactivo Ficoll- Paque y se le agregó 4 mL de sangre previamente diluida por las paredes del tubo cuidando que no se mezclara la sangre con el reactivo de manera que se observaran dos fases. Posteriormente se centrifugó la sangre a 3500 rpm por 30 minutos. Finalizado este tiempo, se extrajo la interfase (donde se encontraban los linfocitos) con ayuda de una pipeta pasteur y se colocaron en otro tubo falcon para diluir 1:2 los linfocitos extraídos con PBS 1X (es decir, por cada 1 mL de linfocitos extraídos, adicionar 2 volúmenes iguales de PBS, con un volumen total de 3 mL). Enseguida, se centrifugaron a 3000 rpm por 5 minutos; terminado este tiempo, se extrajo el pellet de linfocitos y se vaciaron a otro tubo falcon con 2 volúmenes de PBS 1X.

Se determinó la cantidad necesaria de linfocitos para el estudio por medio del recuento de leucocitos con cámara de Neubauer (recuento de leucocitos >1000/ μ L).

4.3.2.3 Preparación de microgeles de agarosa.

Primero, se desengrasaron los portaobjetos sumergiendo en metanol durante 10 minutos. Se preparó una solución de agarosa de punto de fusión normal (NMA), al 1 % en PBS 0.5x, la cual se mantuvo a 37°C, se colocaron 150 μ L en un extremo del portaobjetos y se hizo un barrido sobre todo el portaobjetos con ayuda de un cubreobjetos, se dejaron secar. Después del período de incubación de los linfocitos, se centrifugaron por 5 minutos a 3500 rpm para retirar el extracto de *M. sativa*, se

decantó y se realizaron dos lavados con 500 μ L de PBS 1X. Posteriormente se colocaron 50 μ L de solución de linfocitos después de la incubación a los tiempos de 2 y 24 horas con las diferentes concentraciones de *M. sativa* estudiadas sobre la primera capa de agarosa, junto con 100 μ L de una solución de agarosa de bajo punto de fusión (LMA) al 0.5% en PBS 0.5x mantenida previamente a 37°C, se cubrió inmediatamente con un cubreobjetos de 24 mm x 60 mm. Se dejaron solidificar a 4°C durante 5 minutos y, transcurrido este tiempo, se retiraron los cubreobjetos procurando no romper las capas. Finalmente se depositó una tercera capa de agarosa (LMA) al 0.5% en PBS 0.5x previamente mantenida a 37°C, se cubrió nuevamente con un cubreobjetos y se dejó solidificar durante 5 minutos a 4°C. Se retiró el cubreobjetos y las preparaciones fueron sumergidas en buffer de lisis.

4.3.2.4 Lisis celular.

La solución de lisis se compone de 2.5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 Mm Tris-HCl, DMSO 10%, 1% Triton X-100 y ajustado a un pH 10, donde las preparaciones fueron sumergidas durante 1 hora a 4°C. La solución se enfrió previamente para asegurar la estabilidad de los geles en los portaobjetos (Becerra, 2014).

La alta concentración de sales y detergentes de esta solución permite la desintegración de las membranas citoplasmáticas y nucleares, así como la eliminación de restos citoplasmáticos, RNA y algunas proteínas nucleares (Zúñiga, 2009). A partir de este punto, todo el proceso se realizó en la mayor oscuridad posible para evitar el daño adicional que pudiese producir la luz en el DNA desprotegido.

4.3.2.5 Desnaturalización y electroforesis.

Después de la lisis, las preparaciones se colocaron en una cámara de electroforesis horizontal evitando espacios entre ellas, para asegurar la uniformidad en el paso de la corriente e impedir el movimiento de las preparaciones sometidas al campo eléctrico. Se llenó la cámara con solución de electroforesis de manera que las preparaciones quedaran completamente sumergidas, se dejaron en estas condiciones por 20 min. Una vez transcurrido este tiempo se procedió a una

electroforesis durante 20 min a 25 V y a 0.3 A. Las preparaciones se orientaron teniendo en cuenta que el ADN, al tener carga negativa, migrará hacia el polo positivo.

La solución de electroforesis contiene 1 mM EDTA y 300 mM NaOH con un pH final ajustado a 13. La alcalinidad de esta solución permite la disociación de las hebras de ADN.

4.3.2.6 Neutralización y fijación.

Finalizada la electroforesis, las laminillas se retiraron de la cámara y se colocaron en una caja para someterlo a lavados con buffer de neutralización (3 veces durante 5 min cada vez). Esta solución contiene 0.4 Mm Tris-HCl con un pH ajustado a 7.5.

4.3.2.7 Tinción y visualización

Las preparaciones se tiñeron antes del análisis al microscopio. Para esto, se depositaron 50 μ L de bromuro de etidio a 1 μ g/mL sobre cada preparación y se cubrieron con cubreobjetos.

Para la visualización de daño en el ADN, se realizaron observaciones de ADN teñido con Bromuro de Etidio utilizando un objetivo de 40x en un microscopio con lámpara de fluorescencia, equipado a un filtro de excitación de 480 – 550 nm.

4.4 Diseño experimental:

Cuadro 1. Determinación de la genotoxicidad de *M. sativa* de tres cosechas diferentes.

Grupo	Sustancia	Concentración	Tiempo de exposición (horas)
Control (+)	H ₂ O ₂	200 µM	2 y 24 hrs
Control (-)	PBS	1X	2 y 24 hrs
1a	<i>M. sativa</i> cosecha 1	50 µg/mL	2 y 24 hrs
2a		100 µg/mL	2 y 24 hrs
3a		200 µg/mL	2 y 24 hrs
4a		400 µg/mL	2 y 24 hrs
1b	<i>M. sativa</i> cosecha 2	50 µg/mL	2 y 24 hrs
2b		100 µg/mL	2 y 24 hrs
3b		200 µg/mL	2 y 24 hrs
4b		400 µg/mL	2 y 24 hrs
1c	<i>M. sativa</i> cosecha 3	50 µg/mL	2 y 24 hrs
2c		100 µg/mL	2 y 24 hrs
3c		200 µg/mL	2 y 24 hrs
4c		400 µg/ml	2 y 24 hrs

Se realizó la incubación de linfocitos humanos previamente extraídos de sangre periférica como se explicó en la metodología con los extractos de las 3 cosechas diferentes de *M. sativa* en polvo a diferentes concentraciones, colocando 200 μ L de linfocitos en PBS 1X con 800 μ L de las soluciones a probar, los cuales se incubaron a los tiempos y concentraciones expresados en el Cuadro 1.

Posteriormente se realizó la determinación del ADN dañado por el ensayo cometa en su versión alcalina (mencionado en la metodología) y la observación al microscopio del daño causado por el agente de estudio; tomando fotografías con ayuda de la cámara incorporada al microscopio y se analizaron para medir el cometa formado que representa las bases dañadas que migraron por el gel.

Se analizó la diferencia significativa entre el agente en estudio comparado con el control positivo y el control negativo; cada experimento se realizó por triplicado.

4.4a Cálculos estadísticos:

Cada grupo está representado como el promedio +/- (más/menos) la desviación estándar de tres experimentos. La diferencia significativa del efecto genotóxico producido en los diferentes grupos fue evaluada por medio de la prueba de *t* de *student*, un método estadístico que nos permite establecer la diferencia entre dos medias poblacionales cuando el tamaño muestral es pequeño y nos permite hacer inferencia acerca de la existencia de diferencia entre las medias de las muestras en estudio por medio de una prueba de hipótesis, permitiéndonos establecer una zona de rechazo y aceptación (Mendenhall y col., 2010).

5 RESULTADOS:

En este estudio se utilizó *M. sativa* en polvo de tres cosechas diferentes, de las cuales se realizaron extractos acuosos de concentraciones diferentes para determinar su genotoxicidad; además se añadió como parámetro el período de exposición al extracto acuoso de *M. sativa* para observar si hay alguna relación entre el período de exposición a la sustancia evaluada con su potencial genotóxico. Para ello se comparó el daño al ADN obtenido para cada concentración de las tres cosechas de *M. sativa* contra el control negativo y el control positivo con los tiempos correspondientes de exposición a las sustancias.

Cuadro 2. Resultados del efecto genotóxico de *M. sativa* de diferentes cosechas y a distintas concentraciones en linfocitos humanos por un período de exposición de 2 horas.

Grupo	Sustancia	Concentración	% de ADN dañado
Control (+)	H ₂ O ₂	200 µM	54.78 ± 9.4
Control (-)	PBS	1X	3.6 ± 1.29
1a	<i>M. sativa</i> cosecha 1	50 µg/mL	3.1 ± 1.1
2a		100 µg/mL	4.7 ± 1.6
3a		200 µg/mL	6.7 ± 2.4
4a		400 µg/mL	6.83 ± 2.37
1b	<i>M. sativa</i> cosecha 2	50 µg/mL	3.63 ± 1.41
2b		100 µg/mL	4.51 ± 1.92
3b		200 µg/mL	6.34 ± 1.85
4b		400 µg/mL	7.50 ± 2.39
1c	<i>M. sativa</i> cosecha 3	50 µg/mL	4.14 ± 1.18
2c		100 µg/mL	5.17 ± 1.29
3c		200 µg/mL	6.61 ± 2.24
4c		400 µg/mL	7.28 ± 2.84

En el cuadro 2 se muestran los diferentes grupos experimentales y el porcentaje de daño producido al ADN por las sustancias probadas, el porcentaje de daño de cada grupo se expresa como la media de 3 experimentos, en los cuales se evaluaron 100 células por experimento, así mismo se muestra el promedio +/- la desviación estándar.

Cuadro 3. Resultados del efecto genotóxico de *M. sativa* de diferentes cosechas y a diferentes concentraciones en linfocitos humanos por un período de exposición de 24 horas.

Grupo	Sustancia	Concentración	% de ADN dañado
Control (+)	H ₂ O ₂	200 µM	57.15 ± 5.77
Control (-)	PBS	1X	3.95 ± 2.17
1a	<i>M. sativa</i> cosecha 1	50 µg/mL	4.4 ± 2.1
2a		100 µg/mL	5.8 ± 2.6
3a		200 µg/mL	7.1 ± 3.4
4a		400 µg/mL	7.4 ± 2.1
1b	<i>M. sativa</i> cosecha 2	50 µg/mL	3.8 ± 1.1
2b		100 µg/mL	5.22 ± 2.6
3b		200 µg/mL	7.9 ± 3.4
4b		400 µg/mL	8.15 ± 2.6
1c	<i>M. sativa</i> cosecha 3	50 µg/mL	4.2 ± 1.6
2c		100 µg/mL	5.5 ± 2.3
3c		200 µg/mL	6.9 ± 2.9
4c		400 µg/mL	6.71 ± 1.7

En el cuadro 3 también se muestra los diferentes grupos evaluados y el respectivo daño producido en linfocitos humanos a un período de exposición de 24 horas. El porcentaje de ADN dañado se expresa como el promedio +/- la desviación estándar de tres experimentos, en los cuales se evaluaron 100 células por experimento.

En los cuadros 4 y 5 se muestra la comparación estadística entre el promedio de daño al ADN de tres experimentos obtenido para el control negativo con el promedio obtenido para los extractos acuosos de las diferentes cosechas de *M. sativa*, con la finalidad de determinar si existe diferencia significativa entre los grupos comparados, para ello se utilizó la prueba *t* de *Student* con una $p < 0.05$ (Probabilidad del 5%). El valor de *t* teórica se encuentra establecido en tablas (Mendenhall y col., 2010); en cuanto a la *t* calculada, se obtuvo con la siguiente fórmula:

$$t = \frac{\bar{x} - \mu_0}{s/\sqrt{n}}$$

Donde \bar{x} representa el promedio del porcentaje de daño al ADN de cada concentración (y de cada una de las cosechas) de tres experimentos, μ_0 representa la media de los controles, tanto positivo como negativo (haciendo inferencia a que éstas son las medias poblacionales para establecer las zonas de aceptación y rechazo), s/\sqrt{n} representa el error estándar estimado para \bar{x} .

La zona de rechazo establecida para este estudio está en los valores mayores a $t_{teórica} > 2.9200$, en donde se infiere que existe una diferencia significativa entre la media $\mu_0 =$ control positivo y $\bar{x} = M. sativa$ de las diferentes cosechas y diferentes concentraciones. La zona de aceptación se estableció para valores menores a $t_{teórica} < 2.9200$, infiriendo que no existe diferencia significativa entre la media $\mu_0 =$ control negativo y $\bar{x} = M. sativa$ de las diferentes cosechas y diferentes concentraciones.

Cuadro 4. Comparación del promedio de los diferentes grupos experimentales a las 2 horas de incubación contra el control negativo, mediante la prueba de *t* de Student con $p < 0.05$.

Cosech a	Grupos comparados	T teórica	T calculada	Observaciones
1	PBS vs <i>M. sativa</i> 50 µg/mL	2.9200	0.7874	No hay diferencia significativa
	PBS vs <i>M. sativa</i> 100 µg/mL	2.9200	1.19	No hay diferencia significativa
	PBS vs <i>M. sativa</i> 200 µg/mL	2.9200	2.2463	No hay diferencia significativa
	PBS vs <i>M. sativa</i> 400 µg/mL	2.9200	2.3605	No hay diferencia significativa
2	PBS vs <i>M. sativa</i> 50 µg/mL	2.9200	0.0368	No hay diferencia significativa
	PBS vs <i>M. sativa</i> 100 µg/mL	2.9200	0.8194	No hay diferencia significativa
	PBS vs <i>M. sativa</i> 200 µg/mL	2.9200	2.5631	No hay diferencia significativa
	PBS vs <i>M. sativa</i> 400 µg/mL	2.9200	2.8263	No hay diferencia significativa
3	PBS vs <i>M. sativa</i> 50 µg/mL	2.9200	0.7941	No hay diferencia significativa
	PBS vs <i>M. sativa</i> 100 µg/mL	2.9200	1.1893	No hay diferencia significativa
	PBS vs <i>M. sativa</i> 200 µg/mL	2.9200	2.3261	No hay diferencia significativa
	PBS vs <i>M. sativa</i> 400 µg/mL	2.9200	2.2443	No hay diferencia significativa

Cuadro 5. Comparación del promedio de los diferentes grupos experimentales a las 24 horas de incubación contra el control negativo, mediante la prueba de *t* de Student con $p < 0.05$.

Cosecha	Grupos comparados	T teórica	T calculada	Observaciones
1	PBS vs <i>M. sativa</i> 50 µg/mL	2.9200	0.3872	No hay diferencia significativa
	PBS vs <i>M. sativa</i> 100 µg/mL	2.9200	1.2443	No hay diferencia significativa
	PBS vs <i>M. sativa</i> 200 µg/mL	2.9200	1.613	No hay diferencia significativa
	PBS vs <i>M. sativa</i> 400 µg/mL	2.9200	2.8587	No hay diferencia significativa
2	PBS vs <i>M. sativa</i> 50 µg/mL	2.9200	0.2063	No hay diferencia significativa
	PBS vs <i>M. sativa</i> 100 µg/mL	2.9200	0.86	No hay diferencia significativa
	PBS vs <i>M. sativa</i> 200 µg/mL	2.9200	2.020	No hay diferencia significativa
	PBS vs <i>M. sativa</i> 400 µg/mL	2.9200	2.8112	No hay diferencia significativa
3	PBS vs <i>M. sativa</i> 50 µg/mL	2.9200	0.2934	No hay diferencia significativa
	PBS vs <i>M. sativa</i> 100 µg/mL	2.9200	1.1813	No hay diferencia significativa
	PBS vs <i>M. sativa</i> 200 µg/mL	2.9200	1.771	No hay diferencia significativa
	PBS vs <i>M. sativa</i> 400 µg/mL	2.9200	2.8367	No hay diferencia significativa

Cuadro 6. Comparación del promedio de los diferentes grupos experimentales a las 2 horas de incubación contra el control positivo, mediante la prueba de *t* de Student con $p < 0.05$.

Cosecha	Grupos comparados	T teórica	T calculada	Observaciones
1	H ₂ O ₂ 200 µM vs <i>M. sativa</i> 50 µg/mL	2.9200	81.3748	Hay diferencia significativa
	H ₂ O ₂ 200 µM vs <i>M. sativa</i> 100 µg/mL	2.9200	54.2131	Hay diferencia significativa
	H ₂ O ₂ 200 µM vs <i>M. sativa</i> 200 µg/mL	2.9200	34.6987	Hay diferencia significativa
	H ₂ O ₂ 200 µM vs <i>M. sativa</i> 400 µg/mL	2.9200	35.0429	Hay diferencia significativa
2	H ₂ O ₂ 200 µM vs <i>M. sativa</i> 50 µg/mL	2.9200	62.8329	Hay diferencia significativa
	H ₂ O ₂ 200 µM vs <i>M. sativa</i> 100 µg/mL	2.9200	45.3490	Hay diferencia significativa
	H ₂ O ₂ 200 µM vs <i>M. sativa</i> 200 µg/mL	2.9200	45.3516	Hay diferencia significativa
	H ₂ O ₂ 200 µM vs <i>M. sativa</i> 400 µg/mL	2.9200	34.2641	Hay diferencia significativa
3	H ₂ O ₂ 200 µM vs <i>M. sativa</i> 50 µg/mL	2.9200	74.3314	Hay diferencia significativa
	H ₂ O ₂ 200 µM vs <i>M. sativa</i> 100 µg/mL	2.9200	66.6101	Hay diferencia significativa
	H ₂ O ₂ 200 µM vs <i>M. sativa</i> 200 µg/mL	2.9200	37.2468	Hay diferencia significativa
	H ₂ O ₂ 200 µM vs <i>M. sativa</i> 400 µg/mL	2.9200	28.9691	Hay diferencia significativa

Cuadro 7. Comparación del promedio de los diferentes grupos experimentales a las 24 horas de incubación contra el control positivo, mediante la prueba de *t* de Student con $p < 0.05$.

Cosecha	Grupos comparados	T teórica	T calculada	Observaciones
1	H ₂ O ₂ 200 µM vs <i>M. sativa</i> 50 µg/mL	2.9200	43.5074	Hay diferencia significativa
	H ₂ O ₂ 200 µM vs <i>M. sativa</i> 100 µg/mL	2.9200	34.2080	Hay diferencia significativa
	H ₂ O ₂ 200 µM vs <i>M. sativa</i> 200 µg/mL	2.9200	25.4968	Hay diferencia significativa
	H ₂ O ₂ 200 µM vs <i>M. sativa</i> 400 µg/mL	2.9200	41.0331	Hay diferencia significativa
2	H ₂ O ₂ 200 µM vs <i>M. sativa</i> 50 µg/mL	2.9200	84.0044	Hay diferencia significativa
	H ₂ O ₂ 200 µM vs <i>M. sativa</i> 100 µg/mL	2.9200	34.5944	Hay diferencia significativa
	H ₂ O ₂ 200 µM vs <i>M. sativa</i> 200 µg/mL	2.9200	25.0892	Hay diferencia significativa
	H ₂ O ₂ 200 µM vs <i>M. sativa</i> 400 µg/mL	2.9200	32.6424	Hay diferencia significativa
3	H ₂ O ₂ 200 µM vs <i>M. sativa</i> 50 µg/mL	2.9200	57.3200	Hay diferencia significativa
	H ₂ O ₂ 200 µM vs <i>M. sativa</i> 100 µg/mL	2.9200	38.8958	Hay diferencia significativa
	H ₂ O ₂ 200 µM vs <i>M. sativa</i> 200 µg/mL	2.9200	30.0122	Hay diferencia significativa
	H ₂ O ₂ 200 µM vs <i>M. sativa</i> 400 µg/mL	2.9200	51.3909	Hay diferencia significativa

En los cuadros 4 a 7 se muestran los valores de $t_{calculada}$ obtenidos para las diferentes cosechas de *M. sativa* y en sus diferentes concentraciones junto a la $t_{teórica}$ demostrándose con esta estadística que los extractos acuosos de *M. sativa* en polvo de las tres cosechas en las diferentes concentraciones no presentan diferencia significativa al control negativo, así como a los diferentes períodos de exposición, en cambio, con el control positivo se demostró que hay diferencia significativa.

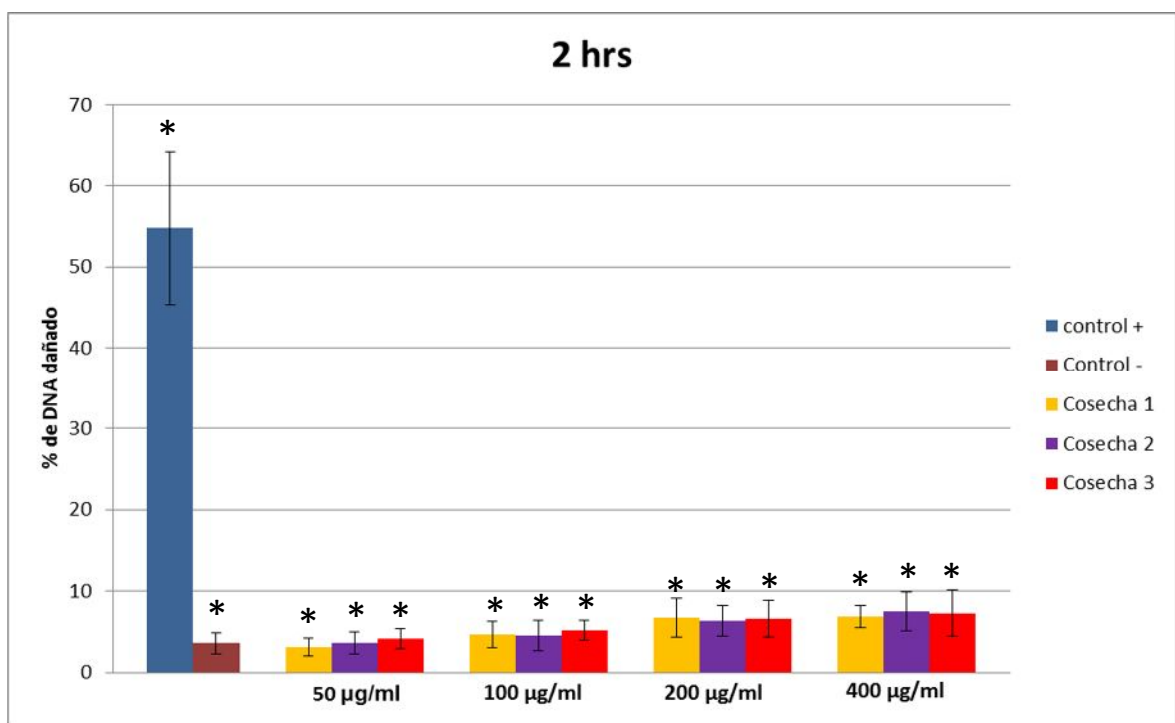


Figura 5. Gráfica representativa del efecto genotóxico de *M. sativa* de las diferentes cosechas probadas en linfocitos humanos, comparados contra un control positivo de peróxido de hidrógeno 200 µM, un control negativo de PBS 1X y a un período de exposición de 2 horas. **t* de Student, $p < 0.05$.

En la figura 5 se muestra una gráfica en la que se encuentran en conjunto los resultados del porcentaje de daño producido al ADN obtenidos para las tres cosechas de alfalfa en un período de exposición de 2 horas probadas en linfocitos humanos, en esta gráfica se observan tres parámetros de comparación, el porcentaje de ADN dañado de los extractos evaluados contra los controles positivo y negativo, las

diferentes concentraciones de los extractos acuosos evaluados y la comparación entre las tres cosechas.

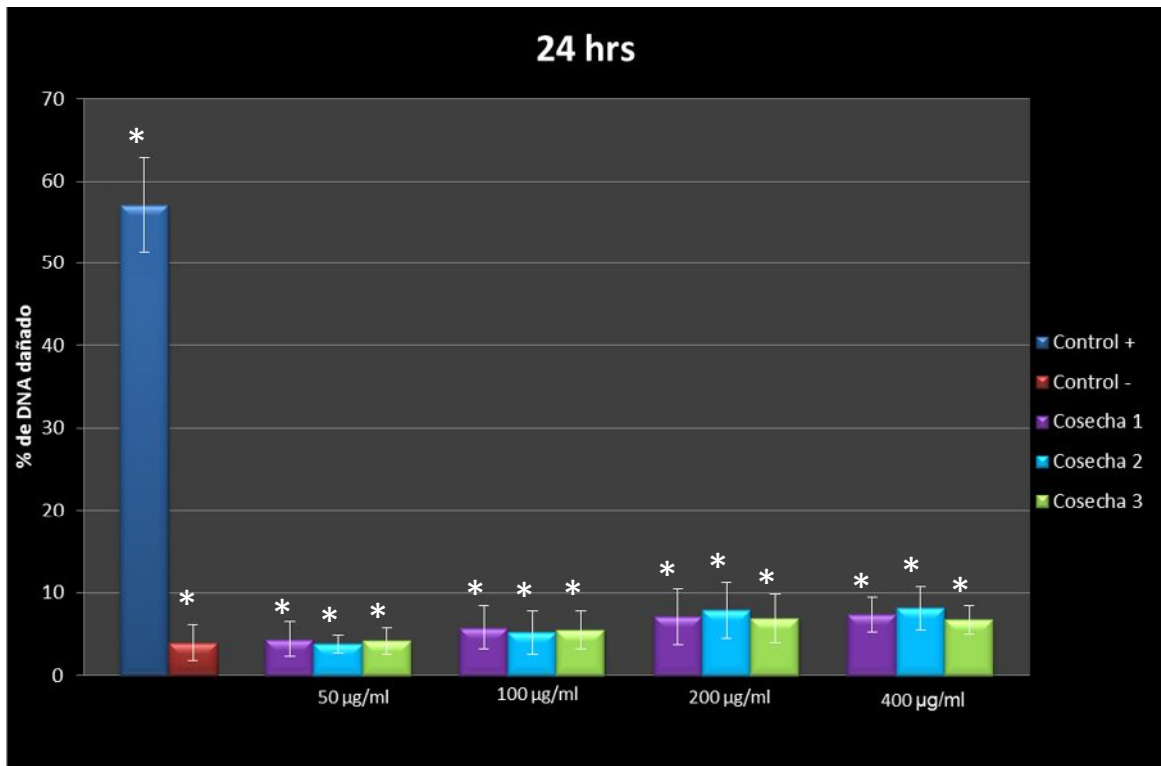


Figura 6. Gráfica representativa del efecto genotóxico de *M. sativa* de las diferentes colectas probadas en linfocitos humanos, comparados contra un control positivo de peróxido de hidrógeno 200 µM, un control negativo de PBS 1X y a un período de exposición de 24 horas. **t* de Student, $p < 0.05$.

Así como en la figura 5, en la figura 6 se muestran los resultados obtenidos del porcentaje de daño al ADN de los linfocitos humanos para las tres cosechas de alfalfa a las diferentes concentraciones, a un período de exposición de 24 horas. Además se muestra el daño obtenido para el control positivo y el control negativo, con el fin de elucidar la diferencia en el daño que causa la alfalfa en comparación a las sustancias control.

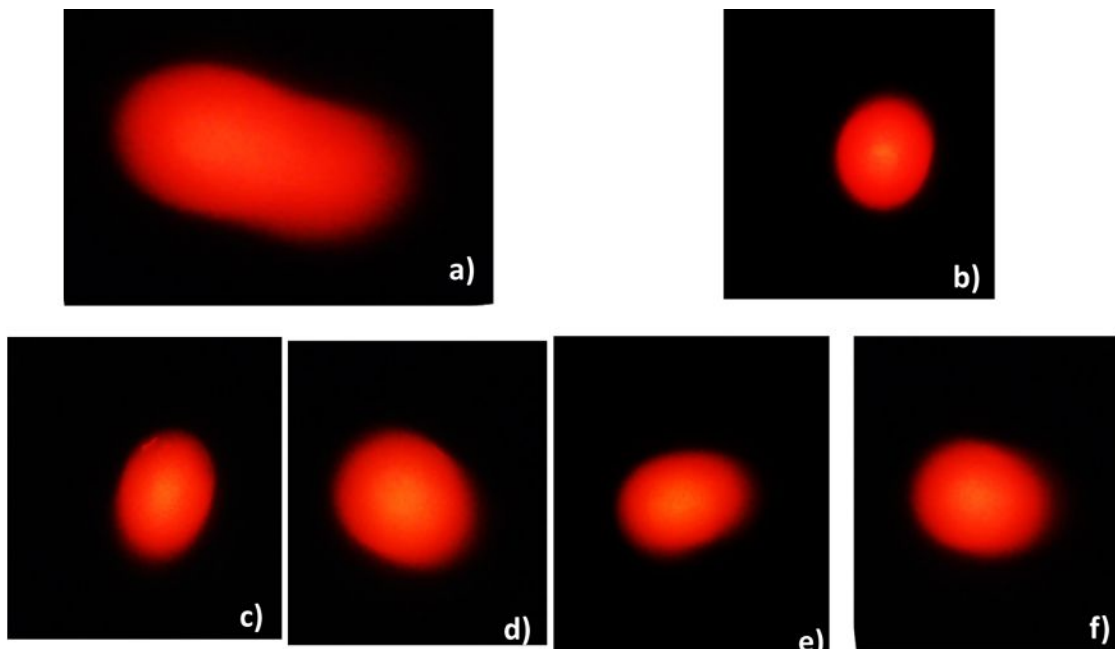


Figura 7. Efecto de la exposición ante: a) Control positivo: H_2O_2 200 μM , b) Control negativo: PBS 1X; c, d, e y f) *M. sativa* de la cosecha 1 en concentraciones de 50, 100, 200 y 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ respectivamente; en linfocitos humanos por un período de 2 horas.

En la figura 7 se observan las fotografías representativas del efecto genotóxico de las diferentes concentraciones de *M. sativa* de la cosecha 1 evaluadas en los linfocitos humanos, en los cuales, se observa la característica cola de cometa, así como los fragmentos dañados de ADN teñidos por el bromuro de etidio, que representan las bases oxidadas del ADN por agentes genotóxicos, las cuales migraron por el campo eléctrico inducido durante la electroforesis. De acuerdo a la figura b), que es el control negativo, se observa una forma redondeada del linfocito pero sin proyecciones que representen un daño severo al ADN; en la figura c) se siguen conservando la forma redondeada del linfocito, permitiendo inferir que a estas concentraciones no hay daño al ADN, en las figuras de la d) a la f) se comienza a observar la forma de un cometa y algunas proyecciones, indicando que hay una presencia de daño al material genético; sin embargo, estadísticamente como se representó en el cuadro 2 y 4, no hay diferencia significativa contra el control

negativo. En la figura a) se muestra el control positivo, cuyas proyecciones representan un daño severo al ADN.

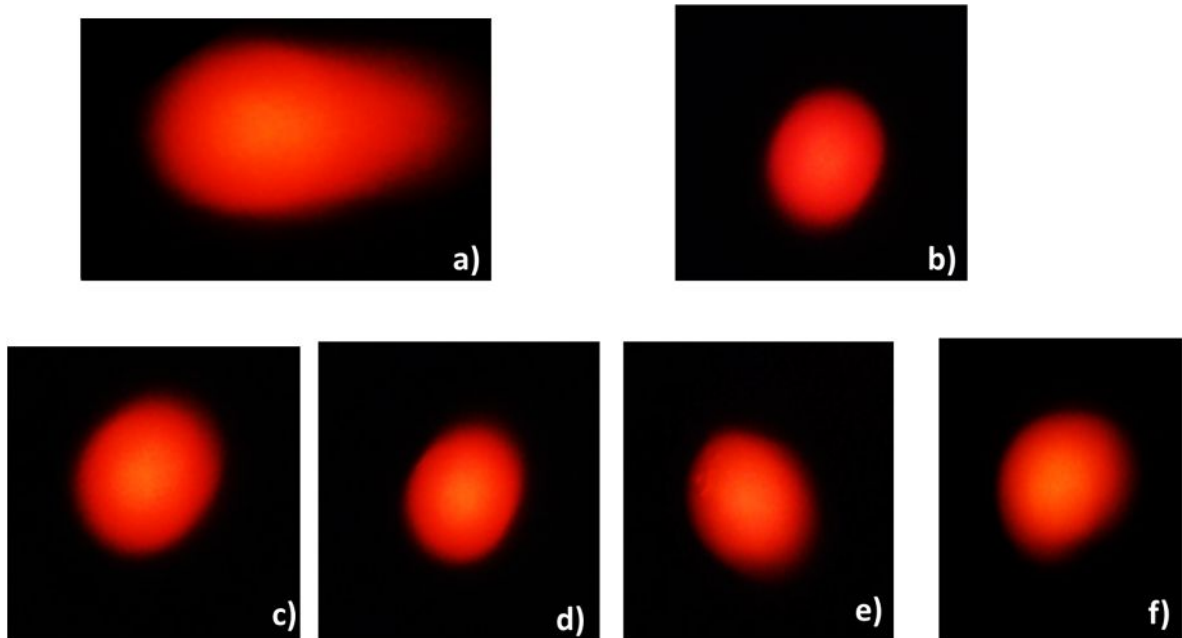


Figura 8. Efecto de la exposición ante: a) Control positivo: H_2O_2 200 μM , b) Control negativo: PBS 1X; c, d, e y f) *M. sativa* de la cosecha 1 en concentraciones de 50, 100, 200 y 400 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente; en linfocitos humanos por un período de 24 horas.

En la figura 8 se observan las fotografías representativas del efecto causado por *M. sativa* de la cosecha 1 en sus diferentes concentraciones y a un tiempo de exposición de 24 horas. De acuerdo a la figura b) el control negativo, se observa una forma redondeada del linfocito pero sin proyecciones que representen daño al ADN; en las figuras de la c) a la f) que representan los linfocitos incubados con las concentraciones del extracto acuoso de *M. sativa* de la cosecha 1, se comienza a observar la forma de un cometa, indicando que hay daño al material genético; sin embargo, estadísticamente como se representó en el cuadro 2 y 4, no hay diferencia significativa respecto al control negativo. En la figura a) se muestra el control positivo, cuyas proyecciones y forma de cometa representan un daño severo al ADN.

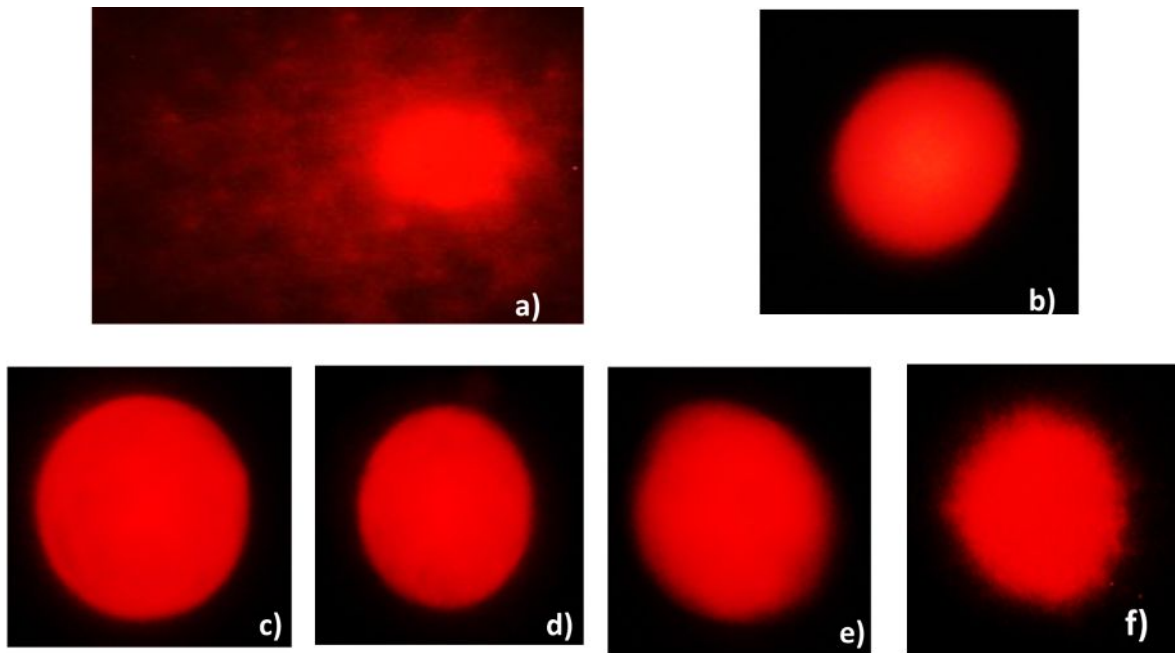


Figura 9. Efecto de la exposición ante: a) Control positivo: H_2O_2 200 μM , b) Control negativo PBS 1X; c, d, e y f) *M. sativa* de la cosecha 2 en concentraciones de 50, 100, 200 y 400 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente; en linfocitos humanos por un período de 2 horas.

En la figura 9 se observan las fotografías representativas del efecto causado por las diferentes sustancias evaluadas en los linfocitos humanos, en las cuales son comparados los resultados para las distintas concentraciones de *M. sativa* de la cosecha 2 a un tiempo de exposición de 2 horas. De acuerdo a la figura b), que es el control negativo, se observa una forma redondeada del linfocito sin proyecciones que indiquen daño al ADN; en la figura c) y d), siguen conservando la forma redondeada del linfocito, permitiendo inferir en que a estas concentraciones no hay daño al ADN, en la figura e) y f) se comienza a observar la forma de un cometa y algunas proyecciones, indicando que hay una presencia de daño al material genético; sin embargo, estadísticamente como se representó en el cuadro 2 y 4, no hay diferencia significativa respecto al control negativo. En la figura a) se muestra el control positivo, cuyas proyecciones representan un daño severo al ADN.

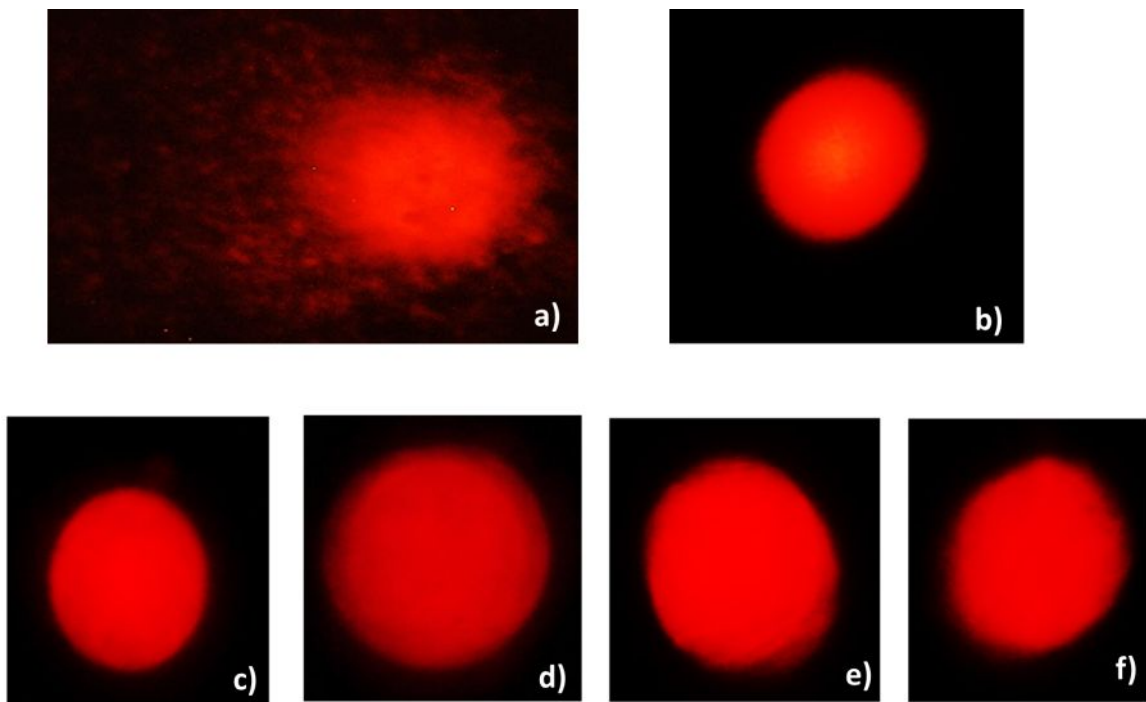


Figura 10. Efecto de la exposición ante: a) Control positivo: H_2O_2 200 μM , b) Control negativo: PBS 1X; c, d, e y f) *M. sativa* de la cosecha 2 en concentraciones de 50, 100, 200 y 400 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente; en linfocitos humanos por un período de 24 horas.

En la figura 10 se observa las fotografías representativas del daño producido por *M. sativa* de la cosecha 2 a distintas concentraciones por un período de 24 horas y su comparación contra el control positivo y el control negativo. De acuerdo a la figura b), que es el control negativo, se observa una forma redondeada del linfocito con una ligera forma de cometa, que estadísticamente no representa daño al ADN; en la figura c) y d), los linfocitos siguen conservando su forma redondeada, permitiendo inferir en que a estas concentraciones no hay daño al ADN, en la figura e) y f) se comienza a observar la forma de un cometa y algunas proyecciones, indicando que hay una presencia de daño al material genético; sin embargo, estadísticamente como se representó en el cuadro 2 y 4, no hay diferencia significativa respecto al control negativo. En la figura a) se muestra el control positivo, cuyas proyecciones representan un daño severo al ADN.

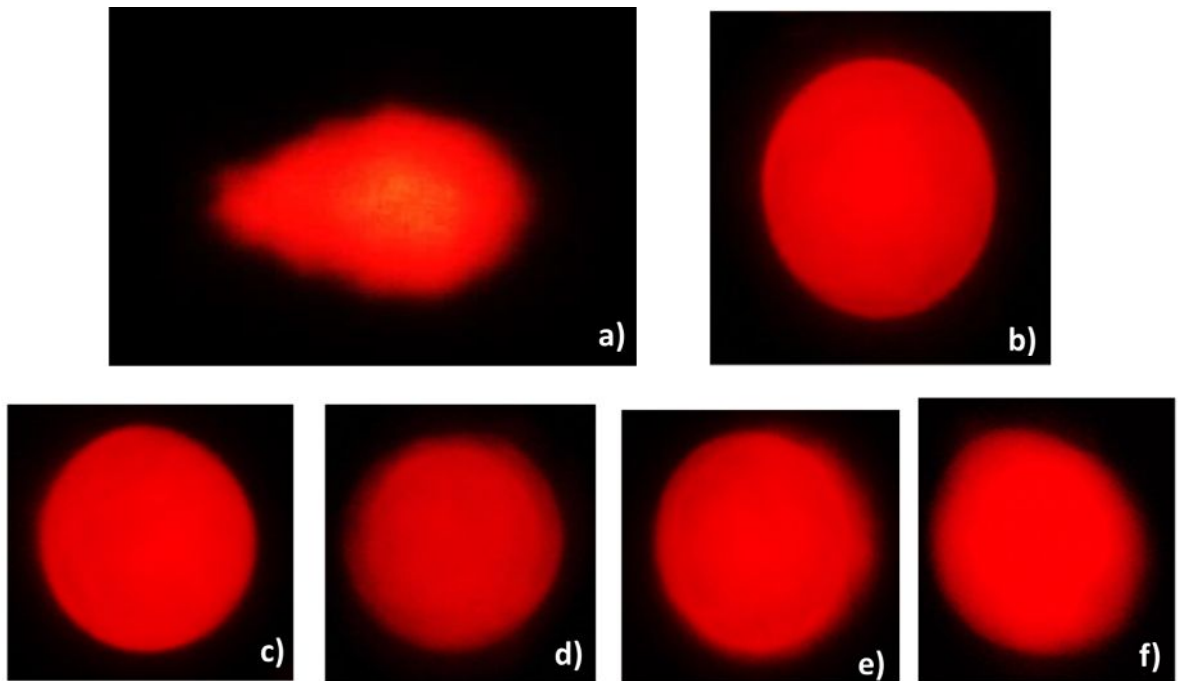


Figura 11. Efecto de la exposición ante: a) Control positivo: H₂O₂ 200 μM, b) Control negativo: PBS 1X; c, d, e y f) *M. sativa* de la cosecha 3 en concentraciones de 50, 100, 200 y 400 μg/mL respectivamente; en linfocitos humanos por un período de 2 horas.

En la figura 11 se observan las fotografías representativas del ADN dañado en los linfocitos humanos por la exposición a los extractos de *M. sativa* de la cosecha 3 en diferentes concentraciones por un período de exposición de 2 horas. De acuerdo a la figura b), que es el control negativo, se observa una forma redondeada del linfocito sin proyecciones que representen daño al ADN; en la figura c) y d), siguen conservando la forma redondeada del linfocito, permitiendo inferir en que a estas concentraciones no hay daño al ADN, en la figura e) y f) se comienza a observar la forma de un cometa y algunas proyecciones, indicando que hay daño al material genético; sin embargo, estadísticamente como se representó en el cuadro 2 y 4, no hay diferencia significativa respecto al control negativo. En la figura a) se muestra el control positivo, cuyas proyecciones representan un daño severo al ADN.

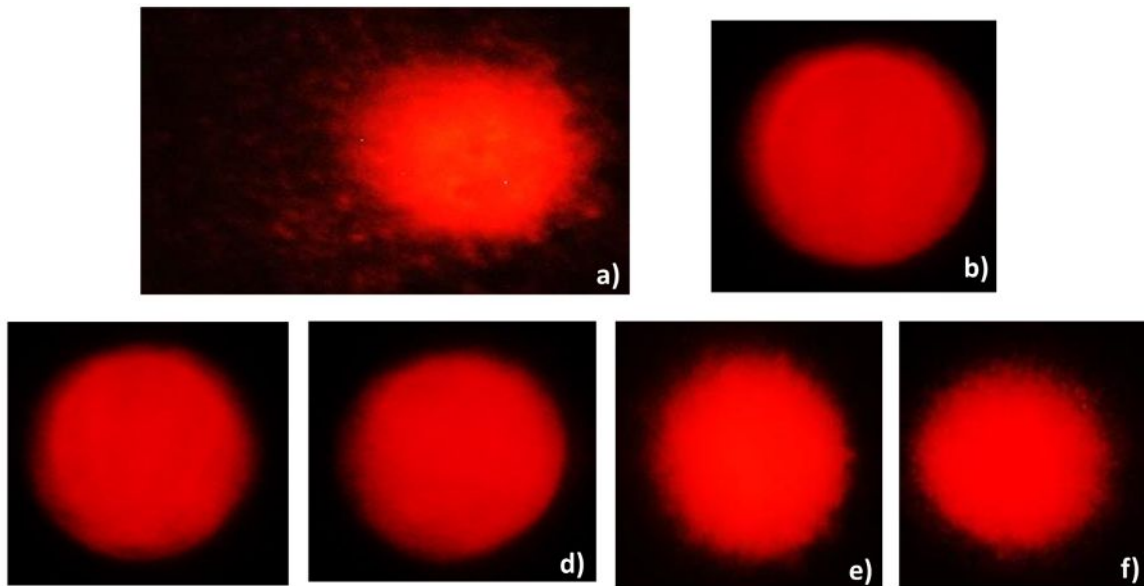


Figura 12. Efecto de la exposición ante: a) Control positivo: H_2O_2 200 μM , b) Control negativo: PBS 1X; c, d, e y f) *M. sativa* de la cosecha 3 en concentraciones de 50, 100, 200 y 400 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente; en linfocitos humanos por un período de 24 horas.

En la figura 12 se observan las fotografías representativas del ADN dañado en los linfocitos humanos por los extractos de *M. sativa* de la cosecha 3 en diferentes concentraciones por un período de exposición de 24 horas. De acuerdo a la figura b) que es el control negativo, se observa una forma redondeada del linfocito con algunas proyecciones aunque estadísticamente no representan daño severo al ADN; en las figuras c) a la f) se observan algunas proyecciones y forma de cometa en los linfocitos pero siguen conservando la forma redondeada, indicando que hay daño al material genético; sin embargo, estadísticamente como se representó en el cuadro 2 y 4, no hay diferencia significativa respecto al control negativo. En la figura a) se muestra el control positivo, cuyas proyecciones representan un daño severo al ADN.

6 DISCUSIÓN

En este estudio se evaluó el efecto genotóxico de la alfalfa (*Medicago sativa* L. “*M. sativa*”) de tres cosechas diferentes a concentraciones de 50, 100, 200 y 400 µg/mL por medio del ensayo cometa en su versión alcalina, los controles positivo H₂O₂ 200 µM y negativo PBS 1X, fueron de referencia para demostrar los efectos genotóxicos en los linfocitos humanos. Cabe mencionar que para *M. sativa* sólo se han hecho reportes acerca de los daños causados *in vivo* (Malinow y col., 1981 y Bardana y col., 1982) y de un compuesto que se encuentran en la planta, el cumestrol (Domon y col., 2001); asimismo, se ha realizado un estudio de mutagenicidad por la prueba de AMES, cuyo resultado fue negativo (White y col., 1983). Se realizaron algunas modificaciones a la metodología del ensayo cometa, de acuerdo a lo observado durante los diferentes experimentos, desde el tiempo de lisis de los linfocitos, los lavados con el buffer de neutralización de las laminillas, hasta la concentración del bromuro de etidio empleado para teñir las bases (para la mejor apreciación de las colas de cometa de los linfocitos). El tiempo de maceración de *M. sativa* se propuso para extraer la mayor cantidad de compuestos, ya que en la preparación del extracto de la planta, el polvo se sedimentaba en el fondo del recipiente, lo que no nos permitiría proyectar una exposición a la alfalfa y sus componentes de manera más prolongada, como para el consumo humano diario o por lo menos con frecuencia recurrente.

Según lo reportado por Becerra-Becerra, 2014, el PBS es empleado en diversos estudios como control negativo ya que es una solución isotónica cuyas sales son inocuas, y se emplea para mantener viables a los linfocitos humanos y no induce lesiones significativas al ADN; en dicho estudio se reportó un porcentaje de daño al ADN del 1.5 al 4%, considerados como no genotóxicos. En este estudio se obtuvieron dos valores que se encuentran entre este intervalo en dos diferentes períodos de exposición al PBS 1X, de 3.6 +/-1.29 (2.31 al 4.89 %) para un período de exposición de 2 horas y de 3.95 +/- 2.17 (1.78 al 6.12%) para 24 horas de exposición, en concordancia a lo reportado por la bibliografía consultada, por lo que se empleó esta

sustancia tanto para control negativo, como para mantener la viabilidad de los linfocitos durante su extracción de la sangre total.

Por otra parte, el peróxido de hidrógeno es un poderoso oxidante, e incluso en concentraciones micromolares puede ejercer dicho efecto en modelos celulares. El mecanismo por el cual el peróxido de hidrógeno causa daños en la estructura molecular del ADN es mediante la oxidación de las bases nitrogenadas, la más susceptible es la guanina, la cual es eliminada del ADN, lo que provoca la formación de rompimientos de cadena sencilla o generando transversiones Guanina Timina, lo que causa la pérdida de la integridad del genoma, conociéndose a este daño como modificación oxidativa del ADN. De acuerdo con lo reportado por Becerra-Becerra, 2014, el peróxido de hidrógeno causa daño al ADN entre el 52- 65% a la concentración de 200 μM ; en este ensayo, se obtuvo un daño entre el 54-57% en períodos de 2 a 24 hrs de exposición, siendo no significativa la diferencia del daño con respecto al tiempo.

En este estudio, por medio de la prueba *t* de *Student* pudimos establecer que *M. sativa* de diferentes cosechas y en las diferentes concentraciones trabajadas no ejerce efecto genotóxico en linfocitos humanos; estableciendo zonas de aceptación y rechazo (aceptación <*t*_{teórica}>rechazo) cuyos datos están registrados en los cuadros del 4 al 7; sin embargo, en las gráficas 5 y 6 se puede observar más a detalle que hubo una elevación del ADN dañado proporcional a la concentración. En el estudio realizado por Soto-Zarazúa, 2015, se comprobó que el efecto antioxidante, así como citotóxico de *M. sativa* en polvo es proporcional a la concentración; similitud confirmada en este estudio. Asimismo, en base a los resultados obtenidos, en donde para las tres cosechas, a la concentración de 50 $\mu\text{g/ml}$ se obtuvo un porcentaje de daño al ADN entre el 2 al 4 %, podemos inferir que esta es la concentración mínima para inducir daño, siendo similar al daño observado para el control negativo.

De acuerdo a lo reportado por Bardana y col. 1982, la L- canavanina es el responsable de desarrollar Lupus Eritematoso Sistémico (LES), una enfermedad autoinmune por lo que establecen que el mecanismo en el que actúa este compuesto

es por ejercer un efecto tóxico sobre el sistema de degradación de ADN, mediante una enzima homeostática que resulta en complejos ADN-anti-ADN. Esto resulta en que la L-canavanina inhibe los mecanismos de reparación del ADN por lo que se desestabiliza, es más susceptible al daño y hay un mayor número de roturas de la cadena.

Sin embargo, en el estudio realizado por Soto-Zarazúa, 2015, en el cual se elaboraron los polvos de *M. sativa* utilizados en este estudio, a partir de las partes aéreas de la planta (hojas y tallos), se utilizaron para la determinación de su contenido fenólico y de flavonoides, y aunque no se reportó el contenido de L-canavanina, se considera como referencia lo reportado por Gawel, 2012, en donde reportan concentraciones de L-canavanina de 80 a 150 mg/Kg del peso de las semillas, en cambio, para las partes aéreas de la planta se reportan cantidades del 0.9 al 1.2 mg/g. Si extrapolamos estas cantidades a las contenidas en nuestros extractos, son cantidades extremadamente pequeñas, por lo que es considerable que no ejerzan efectos tóxicos. Además no se identificó la presencia de cumestrol, un fitoestrógeno que de acuerdo a lo reportado por Price & Fenwick, 1985 y corroborado por Domon y col. 2001, se encuentra en *M. sativa*; por lo que se puede descartar daño al ADN por parte de estas molécula.

De acuerdo a lo reportado por Malinow y col., 1981, al ingerir semillas de alfalfa en elevadas cantidades y de manera continua provoca el desarrollo de pancitopenia de manera aguda y asintomática, la única manera de detectar este padecimiento es por medio de los estudios de laboratorio, en los que coincide la presencia de anemia, leucopenia y presencia de anticuerpos antinucleares. Sin embargo, al dejar de ingerir las semillas, el paciente vuelve completamente a la normalidad, lo que nos hace pensar que los componentes son fácilmente eliminados del organismo y no provocan efectos irreversibles; esto nos permite extrapolar a los resultados obtenidos en este estudio, ya que, los períodos de exposición elegidos para que los componentes de la alfalfa interactuaran con los linfocitos fue muy corto, lo que provocó que no se observara daño significativo al ADN, ya que a la concentración de 400 µg/ml no se observó diferencia significativa respecto al control negativo, aunque si un porcentaje

mayor al 7%, es decir, tres unidades más que el control negativo, por lo que es necesario encontrar una concentración más alta en la cual se observe daño significativo al ADN.

7 CONCLUSIÓN

EL extracto acuoso de alfalfa (*Medicago sativa*) en las concentraciones de 50, 100, 200 y 400 µg/ml no ejercen un efecto genotóxico a 2 y 24 horas de exposición.

8 REFERENCIAS:

Akaogi J, Barker T, Kuroda Y, Nacionales D, Yamasaki Y, Stevens B, Reeves W, Satoh M. Role of non- protein amino acid L-canavanine in autoimmunity. *Autoimm rev.* **2006**; 5: 429-435.

Alcocer-Varela J, Iglesias A, Llorente L, Alarcón-Segovia D. Effects of L- canavanine on T cells may explain the induction of Systemic Lupus Erythematosus by Alfalfa. *Arthrit and Rheum.* **1985**; 28(1):52-57.

Al-Dosari M. *In vitro* and *in vivo* antioxidant activity of alfalfa (*Medicago sativa* L.) on Carbon Tetrachloride Intoxicated Rats. *The Am J Chin Med.* **2012**:40(4):779-793.

Avato P, Bucci R, Tava A, Vitali C, Rosato A, Biały Z, Jurzysta M. Antimicrobial activity of saponins from *Medicago* sp.: Structure-Activity Relationship. *Phytother Res.* **2006**; 20(6):454-457.

Azqueta A, Slyskova J, Langie S, O'Neill I, Collins A. Comet assay to measure DNA repair: approach and applications. *Front in Gen.* **2014**; 5(288):1-8.

Bardana E, Malinow R, Houghton D, McNulty W, Wuepper K, Parker F, Pirofsky B. Diet- induced Systemic Lupus Erythematosus (SLE) in primates. *Am J of Kid Disea.* **1982**; 1(6):345-352.

Becerra-Becerra E. Evaluación del efecto genotóxico del sulfato de cobre y del efecto reparador de N-acetilcisteína en linfocitos humanos. Tesis para obtener el título de Químico Farmacéutico Biólogo. Universidad Autónoma de Querétaro. México; **2014**: 30- 32.

Caunni A, Pribac G, Grozea I, Gaitin D, Samfira I. Design of optimal solvent for extraction of bio-active ingredients from six varieties of *Medicago sativa*. *Chemist Cent J.* **2012**; 6: 1-8.

Cie la Ł, Kowalska I, Oleszek W, Stochmal A. Free radical scavenging activities of polyphenolic compounds isolated from *Medicago sativa* and *Medicago truncatula*

assessed by means of thin-layer chromatography DPPH rapid test. John Wiley & Sons. *Phytochem Anal.* **2012**; 59-65.

Domon O, McGarrity L, Bishop M, Yoshioka M, Chen J, Morris S. Evaluation of the genotoxicity of the phytoestrogen, coumestrol, in AHH-1 TK[±] human lymphoblastoid cells. *Mut Res.* **2001**; 474:129-137.

Dusinska M, Collins A. The comet assay in human biomonitoring: gene- environment interactions, *Mutagenesis.* **2008**; 23(3):191-205.

D'Addabbo T, Tava A, Avato P. Evaluation of nematocidal properties of saponins from *Medicago* spp. *Eur J Plant Pathol.* **2009**; 125:39-49.

Gatouillat G, Alabdul A, Bertin E, Okiemy-Akeli M, Morjani H, Lavaud C, Madoulet C. Cytotoxicity and apoptosis induced by alfalfa (*Medicago sativa*) leaf extracts in sensitive and multidrug-resistant tumor cells. *Nutri and Cancer.* **2014**; 66(3):483- 491.

Gawel E. Chemical composition of lucerne leaf extract (EFL) and its applications as a phytobiotic in human nutrition. *Acta Sci. Pol., Technol. Aliment.* **2012**; 11(3): 303-310.

Houghton P, Patel N, Jurzysta M, Biely Z, Cheung C. Antidermatophyte Activity of *Medicago* extracts and contained saponins and their Structure-Activity Relationship. *Phytother Res.* **2006**; 20:1061-1066.

Juan N, Romero L, Bruno O. Conservación del forraje de alfalfa. INTA C.R. **1995**; Cap.9:173-192.

Karp G. Cell and molecular biology; concepts and experiments. 6a edición. USA: John Wiley & Sons, Inc., **2010**; 552-553.

Khaleel A, Gad M, El-Maraghy S, Hifnawy M, Abdel-Sattar E. Study of hypocholesterolemic and antiatherosclerotic properties of *Medicago sativa* L. cultivated in Egypt. *J of Food and Drug Anal.* **2005**; 13(3):212-218.

Ki-Choon C, Jung-Min H, Sung-Jun B, Beom-Tae K, Dong-Hern K, Minseon C, Seung-Ah L, Gi-Jun C, Da-Hye K, Jeong-Chae L. Chloroform extract of alfalfa (*Medicago sativa*) inhibits lipopolysaccharide-induced inflammation by downregulating ERK/NF- B signaling and cytokine production. *J Med Food*. **2013**; 16(5):410- 420.

Kulling S, Metzler M. Induction of micronuclei, DNA strand breaks and HPRT mutations in cultured Chinese hamster V79 cells by the phytoestrogen coumestrol, *Food Chem. Toxicol*. **1997**; 35:605–613.

Lemus-Rodríguez Z, García-Pérez E, García-Negrín M, Chong-Quesada A. La Alfalfa: Un remineralizante de excelencia en el mundo vegetal. *MEDISAN*. **2003**; 7(4):2-6.

Malinow M, McLaughlin P, Papworth L, Stafford C, Kohler G, Livingston A, Cheeke P. Effect of alfalfa saponins on intestinal cholesterol absorption in rats. *Am. J. Clin. Nutr*. **1977**; 30:2061–2067.

Malinow M, Bardana J, Goodnight S. Pancytopenia during ingestion of alfalfa seeds. *Lancet*. **1981**; 317(8220):615.

Mauriz-Turrado I, Martínez-Pérez J. Agentes genotóxicos, métodos de detección y evaluación. *El rincón de la ciencia*. **2014**; 66:1-2.

Mendenhall W, Beaver R, Beaver B. Introducción a la probabilidad y estadística. Cengage Learning. **2010**; 13a edición:411- 417.

Mohamed B, Abderrahim Z, Hassane M, Abdelhafid T, Abdelkhaleq L. Medicinal plants with potential antidiabetic activity A review of ten years of herbal medicine research (1990–2000). *Int J Diab & Metab*. **2006**; 14:1–25.

Price K, Fenwick G. Naturally occurring oestrogens in foods- A review. *Food add and contam*. **1985** ;2(2):73-106.

Rangel-Sánchez J. Atlas de las plantas de la medicina tradicional Mexicana. Comisión Nacional para el Desarrollo de los Pueblos Indígenas. Fototeca Nacho López. **1993**. Núm. inventario:109071.

SAGARPA. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. Diseño de estrategias de mercado, logística y de adecuación de productos para la integración de la alfalfa Mexicana en el comercio global de forrajes. TSI consult. **2009**. 134-146.

Sen S, Makkar H, Becker K. Alfalfa saponins and their implication in animal nutrition. J Agric Food Chem. **1998**; 46:131-140.

Shao H, Dixon R, Wang X. Crystal structure of vestitone reductase from alfalfa (*Medicago sativa* L). J Mol Biol. **2007**; 369:265–276.

Singh-Bora K, Sharma A. Evaluation of antioxidant and cerebroprotective effect of *Medicago sativa* Linn. against ischemia and reperfusion insult. Hind Publish Corp. **2010**; Vol 2011:1-9.

Singh-Bora K, Sharma A. Phytochemical and pharmacological potential of *Medicago sativa*: A review. Pharma Biol. **2011**; 49(2):211- 220.

Singh-Bora K, Sharma A. Evaluation of anxiolytic effect of *Medicago sativa* in mice. Pharma Biol. **2012**; 50(7):878-882.

Soto-Zarazúa M. Evaluación de la actividad estrogénica, antioxidante y citotóxica de dos productos alimenticios elaborados a base de alfalfa (*Medicago Sativa*) e identificación de sus fitoestrógenos. Tesis para obtener el grado de Maestra en Ciencias Químico- Biológicas. Universidad Autónoma de Querétaro. México; **2015**: 45-90.

Stochmal A, Piacente S, Pizza C, De Riccardis F, Leitz R, Oleszek W. Alfalfa (*Medicago sativa* L.) flavonoids. 1. apigenin and luteolin glycosides from aerial parts. J Agric Food Chem. **2001**; 49:753-758.

Suárez, C. Atlas de las plantas de la medicina tradicional mexicana (Monografía en internet). Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana, UNAM. **1990**. Disponible en www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx.

Swanston-Flatt S, Day C, Bailey C, Flatt P. Traditional plant and treatments for diabetes. Studies in normal and streptozotocin diabetic mice, Diabet. **1990**; 33:462-464.

Wilcox E, Galloway L. Serum and liver cholesterol, total lipids and lipids phosphorum levels of rats under various dietary regimens. Am J of Clin Nutri. **1961**; 9:236-244.

White R, Krumperman P, Cheeke P, Buhler D. An Evaluation of acetone extracts from six plants in the Ames mutagenicity test. Tox Let. **1985**; 15:25-31.

Zúñiga L. Optimizaciones metodológicas del ensayo del cometa y su aplicación en la biomonitorización humana. Barcelona, España. Universitat Autònoma de Barcelona. Memoria para obtener el grado de Doctora en Genética. **2009**.19-37.