



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**“ESTUDIO DEL EFECTO ANTIGENOTÓXICO DEL  
CUACHALALATE (*Amphipterygium adstringens*) EVALUADO  
CON EL ENSAYO COMETA (ELECTROFORESIS UNICELULAR  
EN GEL)”**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

**PRESENTA**

**CAROLINA HERNÁNDEZ GUEVARA**

**DIRIGIDA POR**

**M. en C. LOURDES ELVIA RUIZ FLORES**

**SANTIAGO DE QUERÉTARO, QUERÉTARO, 2006**

**BIBLIOTECA CENTRAL**  
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

## AGRADECIMIENTOS

A mis padres, por ser ustedes quienes me han hecho lo que soy y por dedicar su vida a nosotros que tanto los amamos...sus hijos.

A mis hermanos, por su apoyo, compañía, por todo lo que hemos compartido, sin ustedes mi vida no sería tan feliz, siempre voy a estar ahí para ustedes, los quiero mucho.

A mis abuelitos, porque siempre tienen una sonrisa que dar y tanto que enseñar.

A todos mis tíos y primos, por su apoyo, comprensión y cariño.

A la maestra Elvia, por su confianza, apoyo y amistad.

A Isidro por tanta dedicación a nosotros, sus alumnos. Gracias por tu amistad.

A Ari, Luisa, Susana, Marlen, Malena y Gis; por tantas aventuras compartidas en la facultad y por su amistad, las quiero mucho.

A todos mis compañeros de QFB, generación 2001-2005.

A Azucena, gracias por tu amistad amiguita, te quiero mucho.

A Maritza, Juliana, Eli, Ale, Julio, Diana, Chava, por seguir siendo mis amigos y por todo lo que hemos compartido.

A los profes Sergio Pacheco, Gustavo Pedraza y Raúl Fraga por su apoyo durante toda mi carrera.

A las maestras Refugio Amado y Paty Padilla por su colaboración para la realización de este trabajo.

A las maestras Lupita Martínez y Lupita García, por su apoyo y confianza.

A todos mis maestros y a todo el personal de la facultad de Química y del CEACA.

## ÍNDICE GENERAL

| Contenido  | Página |
|--|--------|
| ÍNDICE GENERAL   | i      |
| ÍNDICE DE CUADROS                                      | iii    |
| ÍNDICE DE FIGURAS                                      | iv     |
| RESUMEN  |        |
| I. INTRODUCCIÓN  | 1      |
| II. ANTECEDENTES                                       | 4      |
| II.1. Plantas medicinales                              | 4      |
| II.2. Cuachalalate                                     | 5      |
| II.2.1. Descripción botánica, taxonomía y distribución | 5      |
| II.2.2. Etnobotánica                                   | 6      |
| II.2.3. Comercio                                       | 7      |
| II.2.3.1 Manejo  | 7      |
| II.2.4. Química  | 7      |
| II.2.4.1. Metabolitos secundarios                      | 7      |
| II.2.4.2. Farmacología y principios activos            | 9      |
| II.3. Cáncer   | 11     |
| II.3.1. Epidemiología                                  | 12     |
| II.3.2. Cáncer de estómago                             | 13     |
| II.4. Genotoxicidad                                    | 13     |
| II.5. Peróxido de hidrógeno                            | 14     |
| II.6. Antimutagénesis                                  | 15     |
| II.7. Ensayo cometa                                    | 16     |
| III. HIPÓTESIS   | 20     |
| IV. OBJETIVOS  | 21     |
| V. METODOLOGÍA   | 22     |
| V.1. Métodos   | 22     |
| V.1.1. Preparación de la corteza de cuachalalate       | 22     |
| V.1.2. Preparación del extracto acuoso                 | 22     |

|   |    |
|---|----|
| V.1.3. Preparación del extracto hexánico                | 22 |
| V.1.4. Aislamiento de linfocitos                        | 23 |
| V.1.4.1 Viabilidad celular                              | 23 |
| V.1.5. Inducción de genotoxicidad en linfocitos humanos | 24 |
| V.1.6. Ensayo genotóxico                                | 24 |
| V.1.7. Ensayo antigenotóxico                            | 24 |
| V.1.8. Ensayo cometa                                    | 25 |
| V.1.8.1. Evaluación del daño al ADN                     | 26 |
| V.1.8.2. Análisis estadístico                           | 26 |
| V.2. Diseño experimental                                | 27 |
| VI. RESULTADOS  | 31 |
| VII. DISCUSIÓN  | 39 |
| VIII. CONCLUSIONES                                      | 45 |
| IX. SUGERENCIAS   | 46 |
| IX. BIBLIOGRAFÍA  | 47 |

## ÍNDICE DE CUADROS

| Cuadro |  | Página |
|--------|--|--------|
| 1      | Mortalidad por tumor maligno de estómago según grupo de edad y sexo  | 13     |
| 2      | Resultados obtenidos del porcentaje de viabilidad celular para ensayo genotóxico   | 32     |
| 3      | Porcentaje de inhibición del daño al ADN obtenido en el ensayo antígenotóxico  | 34     |
| 4      | Resultados del análisis estadístico de Dunnett ( $\alpha < 0.05$ ) para el ensayo antígenotóxico, comparación de la relación longitud diámetro de los tratamientos con el testigo negativo (PBS) | 35     |

## ÍNDICE DE FIGURAS

| Figura |   | Página |
|--------|---|--------|
| 1      | Árbol de Cuachalalate   | 5      |
| 2      | Distribución de <i>A. adstringens</i> en la República Mexicana  | 6      |
| 3      | Estructuras químicas de los componentes principales de la corteza de cuachalalate   | 8      |
| 4      | Distribución porcentual de defunciones por tumores malignos en México   | 12     |
| 5      | Diseño experimental de inducción de daño genotóxico   | 27     |
| 6      | Diseño experimental para el ensayo de genotoxicidad   | 28     |
| 7      | Diseño experimental para el ensayo de antigenotoxicidad   | 29     |
| 8      | Diagrama de flujo para el ensayo de electroforesis unicelular   | 30     |
| 9      | Electroforesis capilar (electroferograma), a partir de una infusión de cuachalalate en cloroformo. Las flechas indican la presencia de los ácidos masticadienónico (derecha) y 3 $\alpha$ -hidroximasticadienónico (izquierda)    | 31     |
| 10     | Inducción de daño genotóxico con peróxido de hidrógeno, Relación longitud/diámetro (L/D) promedio a las diferentes concentraciones y tiempos de incubación  | 31     |
| 11     | Relación L/D promedio obtenido en el ensayo genotóxico  | 32     |
| 12     | Porcentaje de viabilidad celular obtenido a los 60 minutos de incubación en el ensayo antigenotóxico  | 33     |
| 13     | Relación L/D promedio obtenida para el ensayo antigenotóxico  | 34     |
| 14     | Imágenes del ADN de linfocitos expuestos a : A) PBS, B) DMSO, C) Extracto acuoso 2%, D) Extracto hexánico 2%, E) Peróxido de hidrógeno 60 $\mu$ M y F) Extracto hexánico 0.2% posterior a la exposición con peróxido de hidrógeno | 37     |

- 15      Imágenes del ADN de linfocitos expuestos a : a) PBS sin ser sometidos a lisis celular, b) Peróxido de hidrógeno 60  $\mu$ M c, d, e, y f) Extracto acuoso 0.02%, 0.08%, 0.2% y 2% respectivamente, posterior a la exposición con peróxido de hidrógeno, en d, la imagen inferior fue encontrada en mínima proporción (nótese la cromatina, muy abierta), en e la imagen superior fue la encontrada con mayor frecuencia y en f, la imagen inferior parece tener una membrana, esta imagen fue encontrada con menor frecuencia con respecto a la superior

38

## RESUMEN

El cáncer humano es una enfermedad multifactorial con una elevada incidencia y mortalidad. Este padecimiento se asocia con el estilo de vida, antecedentes infecciosos y exposición a radiaciones; por lo que las investigaciones instrumentan acciones preventivas en la búsqueda de tratamientos de origen natural como el uso de plantas. *Amphipterygium adstringens* es un árbol mejor conocido como cuachalalate, su corteza se utiliza en medicina tradicional para el tratamiento de cicatrizaciones, úlcera gástrica y cáncer de estómago principalmente. Es así que el objetivo de este estudio es evaluar la actividad antígenotóxica del extracto acuoso de cuachalalate en linfocitos humanos, mediante el ensayo de Electroforesis Unicelular (ensayo cometa), método que evalúa el daño al ADN celular con aplicación en estudios de genotoxicidad y antigenotoxicidad. En esta investigación, el estudio genotóxico se realizó para evaluar la posible inocuidad del extracto acuoso (EA), a las concentraciones de 0.02, 0.2 y 2%; durante 30, 60 y 90 minutos de incubación a 37°C. En el estudio antígenotóxico, se valoró el efecto del EA a las concentraciones de 0.02, 0.08, 0.2 y 2% sobre linfocitos humanos previamente dañados con peróxido de hidrógeno 60  $\mu\text{M}$ , a los mismos tiempos de incubación empleados en el estudio genotóxico. Para determinar si el efecto antígenotóxico observado en el extracto acuoso de cuachalalate, podría presentarse con el extracto hexánico (EH), en el ensayo antígenotóxico se expusieron los linfocitos a un EH a las mismas concentraciones (p/v) y tiempos de incubación empleadas para el EA. Para evaluar el efecto de los extractos sobre el ADN en las células de estudio se empleó el ensayo cometa mediante la técnica descrita por Singh y colaboradores (1988). Los resultados obtenidos indican que el EA no es genotóxico a los linfocitos (Dunnett,  $\alpha < 0.05$ ) y produce un efecto antígenotóxico dependiente de su concentración, siendo la concentración del 2% la que presenta un 96% de inhibición del daño genotóxico, el cual posiblemente esté asociado a la membrana celular. El EH es genotóxico desde la concentración de 0.08% y potencia su efecto en presencia de peróxido de hidrógeno.



## I. INTRODUCCIÓN

El cáncer humano, en muchas de sus manifestaciones se asocia con la forma de vida, aunque se han identificado neoplasias malignas relacionadas con antecedentes infecciosos, exposición a radiaciones y con la actividad hormonal, por lo que continúan las investigaciones enfocadas a instrumentar acciones preventivas específicas en la búsqueda del incremento de la eficacia de los tratamientos menos agresivos y de origen natural especialmente de plantas.

El estudio científico y el uso adecuado de los productos de origen natural con fines terapéuticos han sido sin duda tan antiguos como la astronomía, la física y la medicina.

Las plantas medicinales constituyen el recurso más conocido y accesible para la población, sus propiedades no sólo son curativas sino que además, poseen grandes virtudes como la capacidad de regular los procesos vitales y prevenir enfermedades. El buen uso de las plantas medicinales dentro de un conjunto de hábitos de vida sana puede evitar que las debilidades de nuestro organismo y la predisposición a padecer ciertas dolencias, evolucionen hasta convertirse en enfermedades declaradas; por lo que es de gran importancia estudiar en forma metódica, plantas utilizadas en medicina tradicional con la finalidad de aprovechar al máximo los recursos naturales, así como la búsqueda de nuevos medicamentos de menor costo que puedan ser aprovechados por la población.

Entre las plantas más utilizadas en medicina tradicional se encuentra *Amphipterygium adstringens*, árbol comúnmente conocido con el nombre de cuachalalate, del cual es su corteza a la que se le atribuyen diversas aplicaciones terapéuticas, principalmente úlcera gástrica y cáncer de estómago. El cáncer de estómago es la segunda neoplasia más frecuente en el mundo, y también ocupa el segundo lugar como causa de muerte de los pacientes que fallecen por cáncer.

La gran aceptación del cuachalalate por la población ha originado el interés de diferentes grupos de investigación por estudiarla, quienes han identificado los componentes principales de sus extractos orgánicos y acuoso, de los cuales se busca determinar las moléculas involucradas en los efectos terapéuticos;

centrándose específicamente en su capacidad antigenotóxica y su posible mecanismo de acción. Al ser el extracto acuoso la forma común de consumo en la población, es elemental evaluar sus efectos genotóxicos y antigenotóxicos que apoyen la efectividad de este extracto en la terapéutica contra el cáncer.

La genotoxicidad es el resultado nocivo de la interacción de agentes químicos o físicos con el aparato hereditario de la célula, y se manifiesta como alteraciones genéticas y/o cambios en el número y estructura de los cromosomas, que pueden incorporarse en generaciones celulares subsecuentes llamadas mutaciones. La determinación genotóxica en agua, aire, alimentos, agentes contaminantes y productos naturales con propiedades terapéuticas, resulta una herramienta útil para la identificación de riesgos a la salud humana y poder desarrollar medidas de prevención y control. Las mutaciones que alteran la expresión génica se consideran como un rasgo común de todos los cánceres, aunque muchas de ellas pueden ser ventajosas o neutras y no ocasionar manifestaciones patológicas. Las alteraciones genómicas asociadas con el cáncer pueden implicar cambios a pequeña escala, como la sustitución de un solo nucleótido, o a gran escala, como reordenaciones cromosómicas, ganancia o pérdida de cromosomas e incluso la interacción de genomas virales con los cromosomas. Las sustancias genotóxicas pueden unirse directamente al ADN o actuar indirectamente mediante la afectación de las enzimas involucradas en la replicación del ADN y causando, en consecuencia, mutaciones que pueden o no desembocar en un cáncer. Las sustancias genotóxicas no son necesariamente cancerígenas, pero la mayor parte de los cancerígenos son genotóxicos. Los bioensayos utilizados para evaluar genotoxicidad pueden realizarse en microorganismos procariontes (bacterias y levaduras) y células eucariontes de insectos, plantas, animales y de humanos.

Entre estos bioensayos se encuentra el de electroforesis unicelular en gel, llamado comúnmente "ensayo cometa", el cual es un método microscópico fluorescente muy sensible, que permite examinar el daño al ADN en células de forma individual, este ensayo tiene importantes aplicaciones en el campo de la genotoxicidad por lo que puede emplearse también en ensayos de antigenotoxicidad.

Este ensayo se fundamenta en la detección de daño al ADN producido por un rompimiento simple o doble en la cadena de nucleótidos, daño oxidativo y entrecruzamientos de ADN-ADN y ADN-proteína, basándose en la fragilidad que poseen los sitios dañados al ser sometidos a un pH superior a trece y su comportamiento en una electroforesis. Los sitios dañados del ADN, producidos por la acción de un agente genotóxico, se debilitan por el pH alcalino, se fragmentan y migran a una velocidad diferente del resto del material nuclear formando la cola del "cometa", que entre más larga sea ésta, mayor será el daño ocasionado al ADN.

Es así, que la presente investigación permitirá estudiar *in vitro* el posible efecto antigenotóxico del extracto acuoso del cuachalalate colaborando así en el conocimiento de los posibles mecanismos involucrados en su acción antigenotóxica.

## II. ANTECEDENTES

### II.1. Plantas medicinales

La herbolaria, se conoce como la práctica terapéutica que utiliza plantas medicinales, que continúa vigente y tiene un gran arraigo en nuestro país. Las plantas medicinales constituyen el recurso más conocido y accesible para grandes grupos de la población mexicana. La OMS reconoce el valor de esta práctica y le otorga gran importancia en los esquemas públicos para la salud (Betancourt, 2001).

El valor de las plantas medicinales está dado por sus constituyentes químicos, generalmente sus metabolitos secundarios, los cuales son responsables de los efectos fisiológicos que producen. En las plantas los principios activos se encuentran biológicamente equilibrados por la presencia de sustancias complementarias que van a potenciarse entre sí, de forma que no se acumulan en el organismo y sus efectos indeseables son limitados (Martínez, 1991).

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

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

En los últimos 15 años el comercio mundial de plantas medicinales se ha incrementado y dentro de los factores que han contribuido a que la población mexicana siga haciendo uso de la medicina tradicional son principalmente la carencia y/o deficiencia de servicios de salud pública y los bajos recursos económicos aunados a los altos costos de los medicamentos de patente (Hersch-Martínez, 1995).

## II.2. Cuachalalate

### II.2.1 Descripción botánica, taxonomía y distribución

*Amphipterygium adstringens* Schiede ex Schlecht es un árbol dioico de aproximadamente 5-10 metros de altura y 40 cm de diámetro, con el tronco torcido, de corteza color moreno grisáceo o gris plomizo con grandes escamas, hojas opuestas, oblongas u oblongo-lanceoladas de 6 a 15 cm, agrupadas en las puntas de las ramas en un número de tres a cinco en el haz, son de color verde opaco y en el envés verde grisáceo (Figura 1). Anteriormente se consideraba al cuachalalate dentro de la familia *Julianaceae* (Fernández, 2003), en 2004 se realiza una reclasificación debido a la presencia de ácidos anacárdicos en la corteza y pasando a formar parte de la familia *Anacardiaceae* (Domínguez, 2005).



Figura 1. Árbol de cuachalalate (Argueta y col, 1994).

Esta especie habita en clima cálido, semicálido y templado; se encuentra desde los 100 a los 3000 m sobre el nivel del mar, crece en zonas perturbadas de bosque tropical caducifolio y subcaducifolio, de matorral xerófilo, bosque espinoso, bosque mesófilo de montaña y bosque de pino-encino (Argueta y col., 1994). Esta planta nativa de México se encuentra distribuida en el centro y sur de la República Mexicana en los estados de Nayarit, Jalisco, Michoacán, Oaxaca, Puebla, Morelos y el Estado de México (Domínguez, 2005) (Figura 2).



Figura 2. Distribución de *A. adstringens* en la República Mexicana. (Argueta y col, 1994)

### II.2.2 Etnobotánica

En México, *Amphipterygium adstringens* es conocida comúnmente como chalalate, cuachalalate, cuachalalá, chalate, cuachalalatl (Distrito Federal), matixerán (Michoacán), volador (Puebla), macerán, pacheco y cuachinalá (Oaxaca); siendo "cuachalalate" el más utilizado. La palabra cuachalalate proviene del náhuatl kojchalalajltli, koj-kuautli=árbol chalalajltli-chala-chichalaca=guajolote silvestre (Zamora, 2003).

Para esta especie se han descrito 44 usos medicinales. En diversos estados de la República Mexicana se menciona que el empleo de la corteza de cuachalalate, es principalmente de la infusión que se obtiene de su cocimiento para tratar úlceras, malestares digestivos, cáncer de estómago, gastritis dolor de estómago, infección o inflamación intestinal, contra la tifoidea, dolor de muelas, fuegos bucales, y ciertas lesiones cutáneas. Para el tratamiento de úlceras se remoja la corteza en agua hasta que esta tome color y se administra como agua de uso. También se emplea en afecciones respiratorias como tos, amigdalitis, resfriados, tuberculosis y enfermedades pulmonares.

Así mismo se utiliza para mejorar la circulación, disminuir la inflamación del riñón, para el tratamiento de infecciones vaginales, fiebre puerperal, flujo vaginal, várices, úlceras varicosas y como analgésico para dolor de cabeza, cintura, espalda, pulmones, hernias y reumas.

Otras aplicaciones terapéuticas son en el tratamiento de fiebres intermitentes, paludismo, caída del cabello, manchas en la piel, gangrena y para disminuir los

niveles de glucosa y colesterol sanguíneos (Navarrete, 1986; Martínez, 1992; Hersch-Martínez, 1995; Argueta y col., 1994).

### II.2.3 Comercio

De acuerdo con un estudio realizado por Hersch-Martínez (1995), el cuachalalate es una de las plantas medicinales que más se comercializan en la zona sur occidente de Puebla y el Distrito Federal. En el Distrito Federal, el mercado de Sonora es uno de los mercados más grandes en los que se comercializan plantas medicinales frescas y secas. Los vendedores de este mercado informaron que cuachalalate solo o en preparados (mezcla con otras especies) es una de las plantas con mayor demanda y que llegan a vender hasta 25 Kg en tres días, el costo varía entre 20 y 25 pesos/Kg; y lo recomiendan principalmente para úlceras, gastritis y para el cáncer en compuesto con otras plantas. Cuachalalate también tiene gran demanda en el estado de Guerrero, comerciantes del mercado "General Adrián Castrejón" de Iguala, Guerrero indicaron que es una de las especies con mayor demanda y lo recomiendan para úlceras, gastritis, dolores menstruales y diabetes a un precio de 80 pesos/Kg.

#### II.2.3.1 Manejo

La planta se recolecta en las áreas de distribución natural de la especie y se utiliza una parte para autoconsumo y otra parte se comercializa en mercados locales. Su aprovechamiento está regulado por las normas NOM-004-RECNAT-1996, NOM-005-RECNAT-1997 y NOM-007-RECNAT-1997

### II.2.4 Química

#### II.2.4.1 Metabolitos secundarios

En México se ha realizado la mayor parte de la investigación química sobre esta planta. La mayoría de los estudios tratan sobre la composición química de la corteza del tallo de esta especie, de ella se han identificado triterpenos, esteroides, compuestos fenólicos y carbohidratos.

Los triterpenoides presentes en esta especie son los ácidos cuachalalaco, 3-epi y 3 $\alpha$ -masticadienónico, isomasticadienónico, epi-oleanólico, instipolinásico, oleanólico, masticadienónico y 3 $\alpha$ -hidroximasticadienónico; entre los compuestos fenólicos se encuentran los ácidos anacárdicos 6-heptadecil-salicílico, 6-nonadecil-salicílico y 6-pentadecil-salicílico. También se han aislado  $\beta$ -sitosterol, una mezcla de ácidos anacárdicos y aldehídos fenólicos. En la Figura 3 se muestra la estructura química de los constituyentes principales de la corteza (Navarrete y col, 1989; Argueta y col. 1994; Olivera y col., 1999).

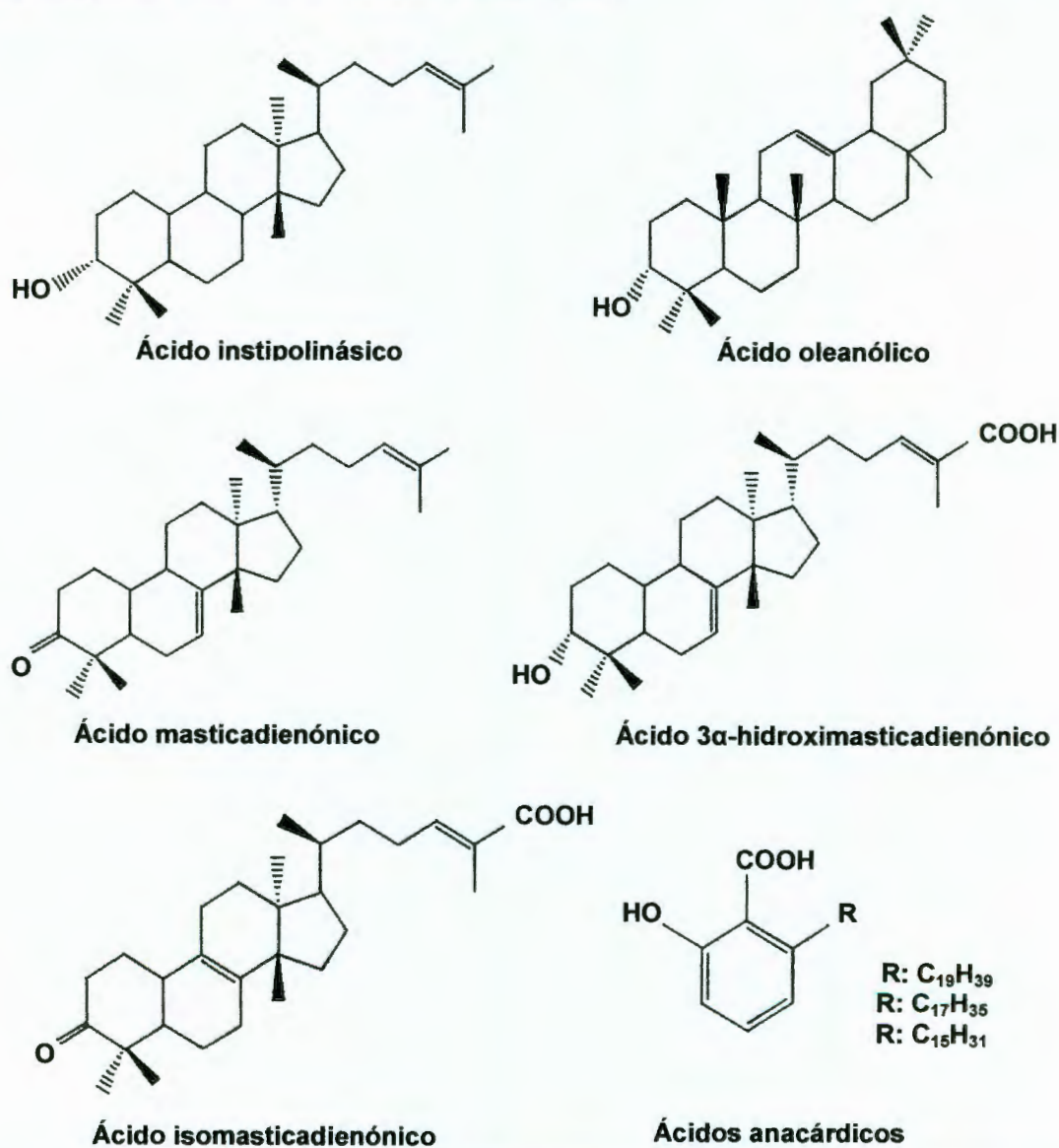


Figura 3. Estructuras químicas de los componentes principales de la corteza de cuachalalate (Rosas, 2005).



En 2004 Makino y colaboradores aislaron 5 nuevos triterpenos tipo tirucalano del extracto etanólico de la corteza de esta especie.

#### II.2.4.2 Farmacología y principios activos

En 1962 González y colaboradores, estudiaron la posible acción antitumoral del cuachalalate, sometiendo ratones con adenocarcinoma mamario a tratamientos con extractos metanólicos, donde se encontró la inhibición del adenocarcinoma en un 90%.

Mata y colaboradores (1991) evaluaron un extracto hexánico y una mezcla de ácidos anacárdicos de la corteza, encontrando que una dosis de 100 mg/Kg del extracto hexánico disminuyó la concentración de colesterol en un 31% administrado por vía intraperitoneal en ratas Wistar, mientras que la mezcla de ácidos anacárdicos no mostraron esta actividad. Navarrete (1982), al estudiar los ácidos masticadienónico y 3 $\alpha$ -hidroximasticadienónico, observó que al administrarlos en ratas Wistar por vía subcutánea a la dosis de 17 mg/Kg ambos mostraron una disminución del colesterol sanguíneo de 45 y 27% respectivamente a las 24 horas después de la administración.

Estudios realizados por Argueta y colaboradores en 1994 demostraron que la administración subcutánea del extracto hexánico de cuachalalate en ratas a una dosis de 100 mg/Kg de peso indujo un efecto hipocolesterolemia significativo en un 31%; así mismo reporta que el cocimiento de la corteza y un extracto de acetato de etilo administrados por vía oral e intraperitoneal, ejercen un efecto antiulcerogástrico inhibiendo la secreción de jugo gástrico y contribuyendo a la rápida cicatrización del epitelio y de la mucosa gástrica.

Benítez en 1998, reporta que al estudiar los ácidos masticadienónico, 3 $\alpha$ -hidroximasticadienónico, 3-epi-oleanólico y  $\beta$ -sitosterol, todos ejercen un efecto gastroprotector a las dosis de 0.1, 0.3, 1, 3, 10, 30 y 100 mg/Kg siendo el ácido 3-epi-oleanólico el compuesto con mayor actividad seguido por el ácido 3 $\alpha$ -hidroximasticadienónico, el  $\beta$ -sitosterol y el ácido masticadienónico.

El efecto antiinflamatorio de cuachalalate se ha evaluado en diferentes animales de experimentación observándose hasta un 93% de inhibición de edema gástrico

(Olivera y col., 1999). Fernández y Navarrete (2001), evaluaron la acción cicatrizante de la corteza, observando una recuperación de tejido epitelial de un 80% de tal manera que el cuachalalate puede utilizarse con fines estéticos pues no deja cicatriz en el tejido.

En 2002 Giner-Larza y colaboradores, evaluaron la citotoxicidad de los ácidos masticadienónico y 3 $\alpha$ -hidroximasticadienónico en un ensayo *in vitro*, obteniendo que el ácido masticadienónico es citotóxico a concentraciones de 30 y 100  $\mu$ M, contrario al ácido 3 $\alpha$ -hidroximasticadienónico el cual no fue activo y además suprime completamente la producción de leucotrienos B<sub>4</sub> de los leucocitos polimorfonucleares.

Todos estos hallazgos fueron el motivo por el cual se realizó el primer protocolo para evaluar la acción antigenotóxica *in vivo* del cuachalalate en contra del daño citogenético producido por un agente alquilante al ADN como lo es la ifosfamida, Martínez y Flores en 2003 observaron que el extracto hexánico produjo una inhibición de micronúcleos de hasta un 90% con la dosis más alta, indicando con esto una acción genoprotectora. Sin embargo mostró un efecto citotóxico en combinación con el mutágeno que se refleja en el hecho que la citotoxicidad es mayor que la observada con la ifosfamida sola.

Los ácidos masticadienónico, 3 $\alpha$ -hidroximasticadienónico, han demostrado que producen citotoxicidad en diferentes líneas celulares cancerígenas de colón, de próstata, de leucemia, de mama, entre otras, reflejada por el aumento en la producción de óxido nítrico (Oviedo y col., 2004). La presencia de estos ácidos es de gran importancia en el estudio de los efectos anticancerígenos que los componentes obtenidos de la corteza puedan ofrecer. Oviedo-Chávez y colaboradores (2004) evaluaron dos modelos agudos inflamatorios para estudiar la actividad antiinflamatoria del extracto acuoso y hexánico, observando que en el modelo en el cual se indujo un edema en la pata del ratón, el extracto acuoso presentó una inhibición del 73.5% y el extracto hexánico de 14.4%. En el segundo modelo, en el cual se indujo un edema en la oreja de ratón, observaron que el extracto hexánico ejerce una actividad dosis-dependiente mientras que el extracto acuoso no presenta tal efecto.

La capacidad antigenotóxica del cuachalalate fue evaluada en ratones de la cepa CD1 por Jiménez (2004), quien utilizó el ensayo cometa y como mutágeno el peróxido de hidrógeno, observando una inhibición de la genotoxicidad y también un efecto citotóxico mayor en los grupos que recibieron el agente mutagénico y el extracto de cuachalalate.

Recientemente, Domínguez en 2005 estudió el ácido 6-nonadecil salicílico (un ácido anacárdico del cuachalalate) y su éster metílico (6-metilnonadecil salicílico), encontrando que el ácido 6-nonadecil salicílico presenta citotoxicidad dependiente de la dosis y el tiempo de exposición, mientras que su éster metílico no presentó esta actividad a las mismas dosis.

Rosas (2005) realizó un nuevo estudio químico y biológico del extracto acuoso de cuachalalate encontrando que los compuestos mayoritarios en extractos orgánicos de la corteza de cuachalalate, son los ácidos masticadienónico y 3 $\alpha$ -hidroximasticadienónico, mientras que en el extracto acuoso es una mezcla de ácidos anacárdicos. Identificó cardanoles y ésteres fenólicos, componentes de la corteza que no habían sido descritos y que muestran una actividad citotóxica en algunas líneas celulares de cáncer humano. Además reporta que el ácido 6-nonadecil salicílico y su éster metílico no muestran actividad genotóxica a las dosis evaluadas.

Quintanar (2005) evaluó el extracto hexánico encontrando que éste no incrementa el intercambio de cromátidas hermanas, por lo que no es genotóxico a las concentraciones evaluadas.

### II.3 Cáncer

El cáncer se caracteriza por un crecimiento celular incontrolado y por la capacidad de extenderse o producir metástasis desde su localización original a otras localizaciones corporales. Las células cancerosas pierden el control sobre el ciclo celular y proliferan rápidamente.

El cáncer presenta la expansión clonal de una célula en la que se ha producido suficiente cambio de ADN genómico como para transformar el fenotipo de la célula. Actualmente se acepta que el cáncer es una enfermedad genética, resultado del

cúmulo de alteraciones en un conjunto de genes que pertenecen a dos grandes grupos, los oncogenes y los genes supresores de tumores, cuyos productos ejercen funciones básicas para el buen funcionamiento, crecimiento y muerte de todas nuestras células (Gardner, 2003).

### II.3.1 Epidemiología

El cáncer ocupa desde 1990 el segundo lugar como causa de muerte en el país y desde 1980, en que el registro de información permitió diferenciar la localización de las neoplasias, siendo las principales causantes de defunciones las de: a) tráquea, bronquios y pulmón, b) estómago y c) cuello del útero (Figura 5).

En el año 2001 el cáncer provocó 55,731 defunciones anuales, 52 y 48% para mujeres y hombres respectivamente, con tasas por 100,000 habitantes de 57 y de 54 respectivamente (RHNM, 2001). Para el 2004 la Secretaría de Salud estimó que la mayoría de los tumores malignos muestran una tendencia ascendente en el mundo, colocándose en el segundo lugar como causa de mortalidad en México, con el 12.7% del total de fallecimientos, sólo después de las enfermedades del corazón (15.9%).



Figura 4. Distribución porcentual de defunciones por tumores malignos en México (RHNM, 2001)

### II.3.2 Cáncer de estómago

El cáncer gástrico concentró el 3% de los casos de cáncer diagnosticados en México en el año 2000, con 3 casos registrados por 100,000 habitantes (Cuadro 1). Los factores de riesgo principales son de tipo dietético y de conservación de los alimentos (la falta de refrigeración), aunque continua el estudio de otros determinantes como la infección por *Helicobacter pylori* (RHNM, 2001).

Cuadro 1. Mortalidad por tumor maligno de estómago según grupo de edad y sexo (RHNM, 2001).

| Grupo edad   | Masculino   | Tasa       | Femenino    | Tasa       | Total       | Tasa       |
|--------------|-------------|------------|-------------|------------|-------------|------------|
| <1           | 3           | 0.3        | 4           | 0.4        | 7           | 0.3        |
| 1 a 4        | 1           | 0.0        | 0           | 0.0        | 1           | 0.0        |
| 5 a 14       | 1           | 0.0        | 1           | 0.0        | 2           | 0.0        |
| 15 a 24      | 15          | 0.1        | 14          | 0.1        | 29          | 0.1        |
| 25 a 34      | 86          | 1.0        | 78          | 0.9        | 164         | 0.9        |
| 35 a 44      | 159         | 2.6        | 178         | 2.8        | 337         | 2.7        |
| 45 a 64      | 810         | 13.0       | 673         | 10.1       | 1483        | 11.5       |
| 65 y más     | 1567        | 68.3       | 1331        | 50.1       | 2898        | 58.5       |
| Se ignora    | 0           | 0.0        | 1           | 0.0        | 1           | 0.0        |
| <b>Total</b> | <b>2642</b> | <b>5.3</b> | <b>2280</b> | <b>4.5</b> | <b>4922</b> | <b>4.9</b> |

\*Tasa por 100 000 habitantes del grupo de edad

### II.4 Genotoxicidad

Todos los organismos vivos se encuentran expuestos a diversas condiciones ambientales o a la acción de agentes exógenos que les pueden provocar efectos adversos, dichas acciones son estudiadas por la toxicología. Esta ciencia se ha subdividido en varias especialidades, entra las que encontramos la toxicología genética, la cual se encarga de relacionar la acción mutagénica de diversas sustancias y sus consecuencias en la salud humana.

Se estima que existen en el mundo más de 70 000 sustancias químicas y que aparecen alrededor de 1000 nuevas anualmente. La exposición a estos compuestos, ya sea durante su formulación, producción o utilización puede tener en algunos casos efectos adversos en la salud. Estos efectos no tienen porque

estar relacionados con lesiones inmediatas y aparentes, sino que pueden tardar incluso años en manifestarse.

Algunas de estas sustancias pueden ser genéticamente activas, siendo capaces de interaccionar con el material genético (ADN). A las sustancias que pueden provocar algún tipo de modificación en la información genética se les denomina genotóxicas y pueden ocasionar efectos mutagénicos o carcinogénicos.

Dichos agentes pueden ser reactivos y actuar directamente, o de otra manera pueden ser biotransformados por enzimas que los hacen más electrofílicos, lo que incrementa su reactividad y por lo tanto pueden actuar indirectamente como promutágenos (Guizar, 1996).

#### II.5. Peróxido de hidrógeno

Para evaluar la acción antígenotóxica del extracto de cuachalalate se requiere de una sustancia reto, ésta debe ser un agente que produzca fragmentación del ADN y por tal razón se ha elegido al peróxido de hidrógeno.

El peróxido de hidrógeno puede reaccionar directamente o después de haberse dissociado en radicales libres. En muchos casos el mecanismo de reacción es extremadamente complejo y puede proceder por catálisis o puede depender del medio donde se realiza la reacción (Barcelo, 1982).

El mecanismo de acción del peróxido de hidrógeno puede explicarse por medio de la formación de radicales libres. Por esta razón, el peróxido de hidrógeno tiene gran capacidad antiséptica y de amplio espectro contra bacterias, hongos, virus y esporas cuando se utiliza de manera adecuada. El oxígeno molecular tiene poca capacidad de oxidar otros compuestos químicos y para ello debe convertirse primero en una forma activa. Existen varias formas de oxígeno activo, denominadas radicales libres de oxígeno, de los cuales, uno de los más importantes es el radical superóxido  $O_2^-$  y otro es el radical peróxido en forma de peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ). Los radicales libres son moléculas inestables que perdieron un electrón y son muy reactivas, su misión es la de remover el electrón que les hace falta de las moléculas que están a su alrededor para obtener su estabilidad. La molécula atacada, que ha perdido un electrón, se convierte

entonces en un radical libre y de esta manera se inicia una reacción en cadena que dañará células y puede ser indefinida si los antioxidantes no intervienen (Jiménez, 2004). El efecto oxidativo que se produce sobre las bases nitrogenadas del ADN tiene por consecuencia la oxidación de guanina a 8-hidroxi guanina; adenina a 8-hidroxi adenina y la transformación de timina a timina glicol. Estos estados químicamente modificados, podrían traer como resultado el apareamiento erróneo de las bases y por lo tanto mutaciones (Wu y col., 2003).

## II.6. Antimutagénesis

Es claro que ciertos químicos poseen propiedades que directa o indirectamente reducen o eliminan la actividad mutagénica de otros químicos y se les conoce como antimutágenos. De hecho, el término antimutágeno fue usado originalmente para describir aquellos agentes que inhiben la frecuencia o velocidad de mutación espontánea o inducida, independientemente del mecanismo involucrado (Madrigal-Bujaidar y col., 1998). Se han realizado diversos esfuerzos para identificar compuestos antimutagénicos, muchos de los cuales provienen de la dieta normal y han demostrado inhibir el daño mutagénico, entre estos compuestos podemos citar; vitaminas, ácidos grasos, fenoles, fibras, elementos traza, productos de fermentación y porfirinas (Brockman y col., 1992). Así, los inhibidores de la mutagenicidad pueden ser clasificados de acuerdo a la etapa durante la cual exhiben sus efectos protectores. Waters y colaboradores en 1990, hacen hincapié en la importancia de distinguir entre los agentes antimutagénicos que actúan fuera de la célula llamados desmutágenos, que causan una modificación química o bioquímica del mutágeno antes de que el ADN se dañe; y aquellos agentes que ejercen su función dentro de la célula se llaman bioantimutágenos, reducen la frecuencia de mutaciones que interfieren en el proceso celular de fijación del mutágeno.

Las mutaciones que alteran el genoma o la expresión génica se consideran un rasgo común de todos los cánceres, aunque las mutaciones pueden ser también ventajosas o neutras y no ocasionar manifestaciones patológicas (Cortinas y Aguirre, 1990). Las alteraciones genómicas asociadas con el cáncer pueden

implicar cambios a pequeña escala, como la sustitución de un solo nucleótido, o a gran escala, como reordenaciones cromosómicas, ganancia o pérdida de cromosomas o incluso interacciones de genomas virales en el cromosoma (Klug y Cummings, 1999).

A pesar de la complejidad de interacciones y del laberinto de posibles mecanismos por los cuales los compuestos naturales pueden ejercer un efecto antimutagénico-anticancerígeno, muchos de estos compuestos parecen actuar conjuntamente para proteger al hombre del cáncer. La gran mayoría de dichos compuestos poseen propiedades antioxidantes y estos antioxidantes naturales pueden actuar por diferentes mecanismos y a distintos niveles del organismo para dar la máxima protección contra daño mutagénico-cancerígeno (Valeminsky y Gichner, 1988).

En estudios recientes, se ha observado un efecto antigenotóxico del cuachalalate sobre la inducción de micronúcleos producidos por ifosfamida (Martínez y Flores, 2003); y mediante el ensayo cometa al evaluar este mismo efecto utilizando el peróxido de hidrógeno como inductor de genotoxicidad, se observó la presencia de algunos cometas característicos de apoptosis, que, a pesar de ser un porcentaje bajo, no descarta la posibilidad de que se ejerza una acción apoptótica como mecanismo anticancerígeno (Jiménez, 2004).

## II.7. Ensayo cometa

El ensayo electroforesis unicelular ha sido propuesto como un biomarcador para detectar efectos tempranos al daño del ADN. Su relevancia recae en la reducida cantidad de muestras celulares requerida, su habilidad de evaluar ADN dañado en células no proliferantes y el hecho de que los procedimientos para obtener suficiente número de células de diferentes tejidos no son invasivos.

Los investigadores Rydberg y Johanson (1978), realizaron la primera cuantificación del daño al ADN en células únicas, embebidas en agarosa sobre un portaobjetos y lisado bajo condiciones alcalinas con posterior neutralización, las células fueron teñidas con naranja de acridina y la extensión del daño del ADN fue cuantificado por la proporción de una tonalidad verde que indicaba ADN de cadena doble, a una



tonalidad roja indicativo de ADN de cadena sencilla con fluorescencia usando un fotómetro.

El ensayo cometa, también llamado -ensayo sobre células aisladas y electroforesis en microgel-; es introducido por Östling y Johanson en 1984 como una técnica para la visualización directa del daño al ADN de cada una de las células. Su experimento consistió en irradiar células suspendidas en una delgada capa de agarosa sobre un portaobjetos continuando posteriormente con su lisis y la electroforesis de dichas células y finalmente su tinción con un colorante fluorescente afín al ADN. El campo eléctrico impulsa el ADN cargado desde el núcleo tanto el relajado como los fragmentos rotos de ADN, los cuales migran atrás, ya que el ADN dañado o roto tiene carga negativa lo cual lo hace migrar en el campo electroforético hacia el ánodo (Klaude y col.,1995). Las imágenes resultantes, subsecuentemente llamadas "cometas" por su apariencia, fueron leídas para determinar la extensión del daño al ADN. Östling y Johanson (1984) observaron que la cantidad de ADN liberado desde la cabeza del cometa durante la electroforesis estaba en función de la radiación aplicada, y que la longitud de la cauda del cometa alcanza una distancia máxima que es definida por las condiciones de electroforesis.

La técnica original de Östling y Johanson (1984) implicaba un método neutro el cual era sensible al efecto del rompimiento simple del ADN. Las condiciones de lisis empleadas por estos autores, fueron poco efectivas al remover todas las proteínas, lo que produjo que la mayor influencia de la radiación apareciera como un halo de ADN perdido, creando un ensayo sensible al rompimiento simple. Condiciones de lisis más estrictas resultaron en una pérdida superior del 95% de las proteínas celulares que permitían a los fragmentos de moléculas dobles migrar. Sin embargo, desde aquel entonces se han realizado importantes modificaciones como la realizada por Singh y colaboradores en 1988, quién usó una electroforesis alcalina para analizar el daño al ADN provocado por un tratamiento con rayos X y peróxido de hidrógeno lo que permitió aumentar la sensibilidad del ensayo pudiéndose evaluar una mayor cantidad de daños al ADN. El número de publicaciones con

este ensayo se ha ido incrementando con los años, principalmente en condiciones alcalinas (Klaude y col., 1995).

Ejemplos del empleo del ensayo cometa en su versión alcalina para detectar daños al ADN son las publicaciones realizadas en 1994 por Jaiswal y colaboradores, en donde se correlaciona el daño al ADN de las células de epitelio cervical y leucocitos en sangre periférica en pacientes con lesiones precancerosas en cérvix y su susceptibilidad a presentar cáncer.

El ensayo cometa también ha sido empleado en linfocitos para evaluar el daño ocasionado al ADN en pacientes con cáncer tratados con quimioterapia incluyendo ciclofosfamida, ya que con esta técnica es factible determinar la disminución de ADN afectado, debido al tratamiento (Vaghef y col., 1997).

Valverde y colaboradores en 1999 aplicaron el ensayo cometa en linfocitos de sangre completa, en células epiteliales nasales, en células epiteliales bucales para ver el daño al ADN producido por diversos contaminantes ambientales de la ciudad de México, obteniendo como resultados mayor daño al ADN en zonas de exposición altas a contaminantes como es el caso del Sur de México a comparación del Norte de la misma ciudad, el autor concluye que ésta técnica es muy sensible para detectar daño al ADN pero no es específico para determinar la fuente del daño.

El empleo del ensayo cometa, cómo técnica de medición del daño al ADN se ha usado como una alternativa para el estudio genotóxico de nuevos fármacos en comparación con técnicas como la medición de aberraciones cromosómicas, como es el caso del estudio de Giannotti y colaboradores (2002) en donde realizan una comparación entre dichas técnicas, obteniendo como resultado que el ensayo cometa siempre presentó resultados más altos que la prueba citogenética, es decir, la sensibilidad para mostrar daño al ADN fue mayor con el ensayo cometa.

Collins, 2004, evaluó el daño causado por estrés oxidativo al ADN en un cultivo de fibroblastos de pulmón provenientes de ratones jóvenes y viejos en presencia y ausencia de una sustancia reto, teniendo como resultados mayores daños al ADN en ratones viejos que en jóvenes debido a que los ratones viejos son más susceptibles al daño oxidativo que los jóvenes. Concluyendo que este ensayo es

adecuado para evaluar el daño al ADN, sin embargo, el autor asevera que es difícil precisar el tipo específico de daño con este ensayo.

El ensayo cometa fue empleado por Chen y col, 2004 para estudiar el Honokiol, un potente candidato quimioterapéutico para carcinomas colorectales, en donde se aplicaron diferentes concentraciones de Honokiol a células con carcinoma colorrectal, encontrando que Honokiol induce apoptosis en células tumorales. Se analizaron los fragmentos de ADN mediante el ensayo cometa, resultando menores migraciones de dichos fragmentos en células tratadas a comparación de las no tratadas.

El ensayo cometa ha sido empleado en diversos estudios *in vitro* e *in vivo* para evaluar el daño y reparación del ADN inducido por diversos agentes en distintas células de mamíferos (Olive y col., 1994). Miyamae y colaboradores (1998) determinaron que el metilmetanosulfonato y la dietilnitrosamina producen muerte celular por apoptosis, el cual es dependiente del tiempo de exposición al mutágeno y del órgano analizado. Palyvoda y colaboradores (2003) estudiaron en linfocitos de individuos sanos y pacientes con cáncer, la capacidad de reparación del ADN, encontrando que en las personas con cáncer este mecanismo está afectado. Este ensayo se ha empleado como indicador de genotoxicidad de fármacos generadores de radicales libres, tintes para cabello, colorantes sintéticos -presentes en alimentos- y anestésicos inhalantes; (Blasiak y col., 2003; Cho y col., 2003; Macioszek y Kononowicz, 2004; Szyfter y col., 2004) y como indicador de apoptosis (Kubota y col., 2004; Wada y col., 2003; Jiménez, 2004) y en todos ellos se ha observado que el ensayo cometa es un buen indicador de daño y reparación del ADN.

### III. HIPÓTESIS

El extracto acuoso de *Amphipterygium adstringens* (cuachalalate) produce un efecto antigenotóxico en linfocitos humanos dañados con peróxido de hidrógeno.

## IV. OBJETIVOS

### IV.1 General

Evaluar la actividad antigenotóxica del extracto acuoso de *Amphipterygium adstringens* (cuachalalate) utilizando el ensayo cometa como bioindicador.

### IV.2 Específicos

- Identificación de la presencia de los ácidos masticadienónico y 3 $\alpha$ -hidroximasticadienónico en la corteza de cuachalalate empleada, mediante electroforesis capilar.
- Estandarizar la técnica para separar linfocitos de sangre periférica humana.
- Establecer, mediante el empleo del ensayo cometa, las concentraciones y los tiempos de incubación en el que el peróxido de hidrógeno induce en linfocitos humanos un efecto genotóxico.
- Estudiar, utilizando el ensayo cometa, la capacidad del extracto de cuachalalate para inhibir la genotoxicidad inducida por peróxido de hidrógeno en linfocitos humanos.
- Evaluar el efecto del extracto hexánico, en linfocitos expuestos y no expuestos a peróxido de hidrógeno; empleando el ensayo cometa

## V. METODOLOGÍA

### V.1. Métodos

#### V.1.1. Preparación de la corteza de cuachalalate

La corteza con la cual se prepararon los extractos de cuachalalate, se adquirió en el mercado Escobedo del municipio de Querétaro. Dicha corteza fue triturada hasta obtener un polvo fino. La corteza triturada se mantuvo a temperatura ambiente en un desecador. Un gramo de esta corteza triturada se envió para análisis de identificación a la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán de la Universidad Nacional Autónoma de México.

#### V.1.2. Preparación del extracto acuoso

El extracto acuoso de cuachalalate se preparó al 2% en agua tridestilada. Se calentó un volumen de 5ml de agua a punto de ebullición, se retiró del calor y se depositó 0.1 g de corteza triturada y se mantuvo tapada y protegida de la luz en reposo durante 30 minutos. Al término de este tiempo se filtró con una gasa estéril, y se mantuvo a temperatura ambiente hasta su uso. El extracto fue preparado el mismo día de cada experimento y el sobrante fue desechado.

#### V.1.3. Preparación del extracto hexánico

El extracto hexánico de cuachalalate se obtuvo de 17.2g de corteza con dos porciones de 300 mL de hexano a reflujo durante una hora a 46°C. El extracto se concentró por eliminación del disolvente en un rotavapor a presión reducida. El extracto obtenido se disolvió con 7 mL de dimetilsulfóxido (DMSO) concentrado y se conservó en refrigeración a 4°C. La correlación de la concentración del extracto hexánico con respecto al extracto acuoso se realizó a partir de los gramos de corteza de los cuales se obtuvo el extracto hexánico; y las diluciones se realizaron con DMSO concentrado.

#### V.1.4. Aislamiento de Linfocitos

Las muestras de sangre utilizadas fueron de donadores clínicamente sanos; ésta fue obtenida por punción venosa y colectada en tubos con EDTA como anticoagulante.

Para el aislamiento de linfocitos se agregó a un tubo cónico de centrífuga de 15 ml 3.0 ml de Histopaque-1077 Sigma®, el cual se llevó a temperatura ambiente ( $T_a$ ) y se adicionaron 3 ml de sangre dejándola resbalar lentamente por las paredes del tubo y se centrifugó a 400 xg (1495 rpm) durante 30 minutos a  $T_a$ . Posteriormente se retiró el plasma que quedó en la parte superior con una pipeta Pasteur y después se aspiró la interfase de linfocitos depositándola en otro tubo limpio con 10 ml de solución amortiguadora de fosfatos a pH de 7.4, la suspensión se homogeneizó cuidadosamente y se centrifugó a 250 xg (1057rpm) durante 10 minutos. Se realizaron dos lavados más, bajo estas condiciones y por último se resuspendieron las células en 10 mL de solución amortiguadora de fosfatos, a esta suspensión celular se le determinó el porcentaje de viabilidad y el número de células por mL.

##### V.1.4.1. Viabilidad celular

Se tomaron 40  $\mu$ L de la suspensión celular y se mezclaron con 40  $\mu$ L de colorante azul de tripano (0.4%), se dejaron reposar durante dos minutos y posteriormente se procedió a llenar con esta mezcla la cámara de Neubauer. El conteo de células se realizó en los cinco cuadros de la cámara, lo más rápido posible para evitar que la muestra se seque. Se determinó la cantidad total de células, el número de células viables y no viables, los cálculos se realizaron empleando la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{No. de células}}{\text{ml}} = \left( \frac{\text{No. células contadas}}{5} \right) (10^4)$$

El número de células viables por mL promedio empleado fue de  $3 \times 10^5$  (Woźniak y Blasiak, 2004) con una viabilidad promedio de 96%.

#### V.1.5. Inducción de genotoxicidad en linfocitos humanos

Se evaluó la genotoxicidad inducida por el peróxido de hidrógeno a las concentraciones de 60, 175 y 200  $\mu\text{M}$  reportadas para sangre periférica (McKelvey-Martin y col., 1993, Cho y col., 2003) durante 30, 60 y 90 minutos de incubación a 37°C con linfocitos humanos y se procedió a realizar el ensayo cometa como se describe en el punto 5.1.8. En base a los resultados de este estudio se estableció que la concentración adecuada de peróxido de hidrógeno para utilizarse como testigo positivo fue la de 60  $\mu\text{M}$ . El diseño experimental se muestra en la Figura 5.

#### V.1.6. Ensayo genotóxico

Para el ensayo genotóxico se estudió el extracto de cuachalalate a las concentraciones de 0.02, 0.2 y 2% en base al estudio realizado por Jiménez en 2004; durante 30, 60 y 90 minutos de incubación. Utilizándose como testigo positivo peróxido de hidrógeno 60  $\mu\text{M}$  y como testigo negativo solución amortiguadora de fosfatos a pH 7.4. El volumen total en cada muestra se ajustó de modo que todas tuvieran igual concentración celular. Al término de cada tiempo de incubación, las células se lavaron 3 veces con solución amortiguadora de fosfatos y por centrifugación a 1500 rpm durante 5 min. Posteriormente se determinó la viabilidad celular y se procedió a realizar el ensayo cometa. El diseño experimental se muestra en la Figura 6.

#### V.1.7. Ensayo antígeno tóxico

Para observar el efecto del extracto acuoso de cuachalalate sobre linfocitos dañados con peróxido de hidrógeno, los linfocitos fueron tratados con peróxido de hidrógeno 60  $\mu\text{M}$  durante 30, 60 y 90 min a 37°C, al término de la incubación fueron lavados 3 veces con solución amortiguadora de fosfatos y por centrifugación a 1500 rpm durante 5 min. Posteriormente, los linfocitos fueron expuestos al extracto acuoso y hexánico de cuachalalate a las concentraciones de 0.02, 0.08, 0.2 y 2% p/v (determinadas en el ensayo genotóxico) e incubados los tiempos mencionados. En este ensayo se utilizó como testigo positivo peróxido de hidrógeno 60  $\mu\text{M}$  y



como testigo negativo solución amortiguadora de fosfatos a pH 7.4, extractos acuoso al 0.2% y hexánico a las concentraciones de 0.02, 0.08 y 0.2%. Al término de cada tiempo de incubación, las células se lavaron 3 veces con solución amortiguadora de fosfatos y por centrifugación a 1500 rpm durante 5 min. Se determinó la viabilidad celular y se procedió a realizar el ensayo cometa. El diseño se muestra en la Figura 4.

#### V.1.8. Ensayo cometa

La técnica que se empleó fue la descrita por Singh y colaboradores en 1988. Las células por analizar se concentraron centrifugando a 1500 rpm durante 5 minutos, el botón celular se resuspendió en 200  $\mu$ L de agarosa de bajo punto de fusión (LMPA) al 0.5 % a 37°C. Esta suspensión se homogeneizó y se colocaron 75  $\mu$ L de ésta sobre una laminilla donde previamente se había dejado solidificar una capa de agarosa de punto normal de fusión (NMP) al 1% y se cubrió con un cubreobjetos para distribuir las células en toda la laminilla, colocándola en una cama de hielo para su solidificación (3-5 minutos). Cuidadosamente, se removió el cubreobjetos y se añadió una tercera capa de 75  $\mu$ L de LMPA a cada laminilla, se colocaron nuevamente sobre la laminilla los cubreobjetos y se pusieron a solidificar sobre hielo. Se removieron los cubreobjetos y se depositaron lentamente las laminillas en la solución de lisis fría (NaCl 2.5 M, Trizma 10 mM, EDTA 100 mM, Tritón X-100 1%, DMSO 10%), las laminillas se mantuvieron en esta solución en refrigeración a 4 °C durante 17 horas. La preparación de las laminillas se realizó por duplicado.

El procedimiento para electroforesis que se realizó, fue en condiciones alcalinas a pH>13. Las laminillas se sacaron de la solución de lisis y se colocaron en la cámara de electroforesis, donde posteriormente se depositaron 1470 mL de la solución amortiguadora de electroforesis (EDTA 200 mM, NaOH 10 N, pH>13) cubriendo completamente las laminillas (sin burbujas sobre la agarosa). Las laminillas se dejaron reposar en la solución amortiguadora alcalina por 20 minutos para permitir que se desenrolle el ADN y se exprese el daño álcali-lábil. Al término de este tiempo se encendió la fuente de poder, se programó a 25 V y 300 mA, y la electroforesis se realizó durante 20 min. Una vez transcurrido este tiempo se apagó

la fuente de poder, se retiraron cuidadosamente las laminillas de la cámara y se cubrieron con la solución amortiguadora de neutralización (Tris 0.4 M, pH 7.5) durante 5 minutos, se escurrieron y se repitió este paso dos veces más. Por último las laminillas se fijaron durante 5 minutos en etanol absoluto.

Los procedimientos desde la colocación de las células en las capas de agarosa fueron realizados protegidos de la luz para evitar el daño al ADN.

#### V.1.8.1 Evaluación del daño al ADN

La tinción de las preparaciones se realizó con 60  $\mu$ L de colorante bromuro de etidio 0.002%, el cual se depositó sobre cada laminilla y se cubrió con un cubreobjetos, asegurándose que se cubriera la muestra. Se limpió el exceso de colorante en los lados y por la parte posterior. Para visualizar el daño al ADN, las preparaciones se observaron usando un microscopio de fluorescencia equipado con un filtro de excitación de 515-560 nm y un filtro de barrera de 590 nm, usando un micrómetro ocular y el objetivo de 40X., la evaluación se realizó observando 100 nucleoides por cada preparación y midiendo la longitud de la cauda (X) y el diámetro celular (Y). Después de leer las laminillas, se removió el cubreobjetos y se fijaron nuevamente con etanol absoluto se dejaron secar y se guardaron a temperatura ambiente.

#### V.1.8.2. Análisis estadístico

La longitud y el diámetro de cada una de las 100 células observadas por tratamiento, se analizaron estadísticamente con la prueba de ANOVA y comparaciones múltiples de Dunnett con  $\alpha=0.05$  entre los grupos experimentales. Para el ensayo antígenotóxico se evaluará el porcentaje de inhibición el cual se calculó de la siguiente manera:

$$\% \text{ de inhibición} = 100 - \left[ \frac{\text{Relación L/D obtenida en el ensayo antígenotóxico}}{\text{Relación L/D obtenida por el peróxido de hidrógeno } 60 \mu\text{M}} (100) \right]$$

El diagrama de flujo de la metodología para el ensayo cometa se muestra en la Figura 5.

## V.2. Diseño experimental

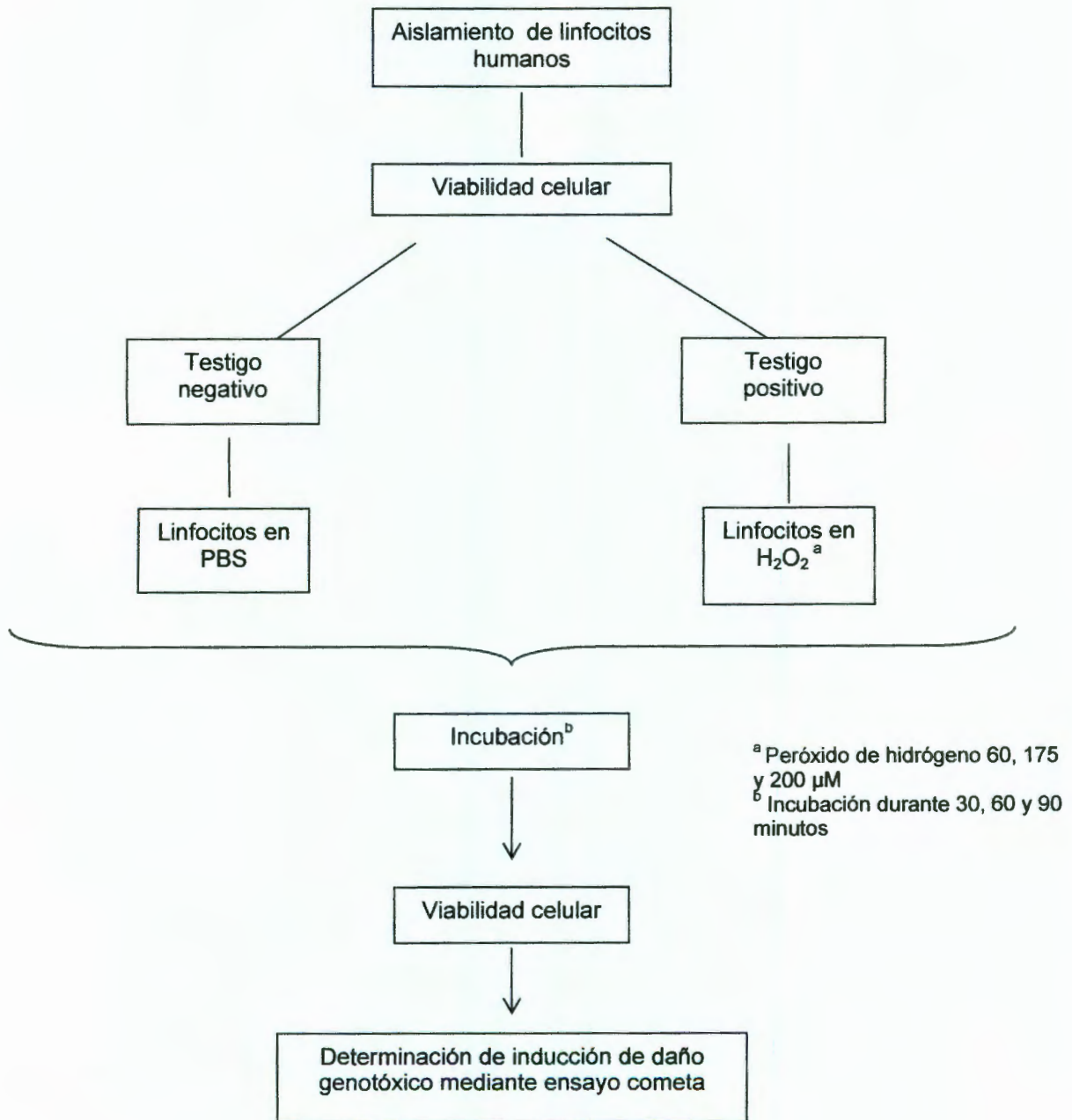
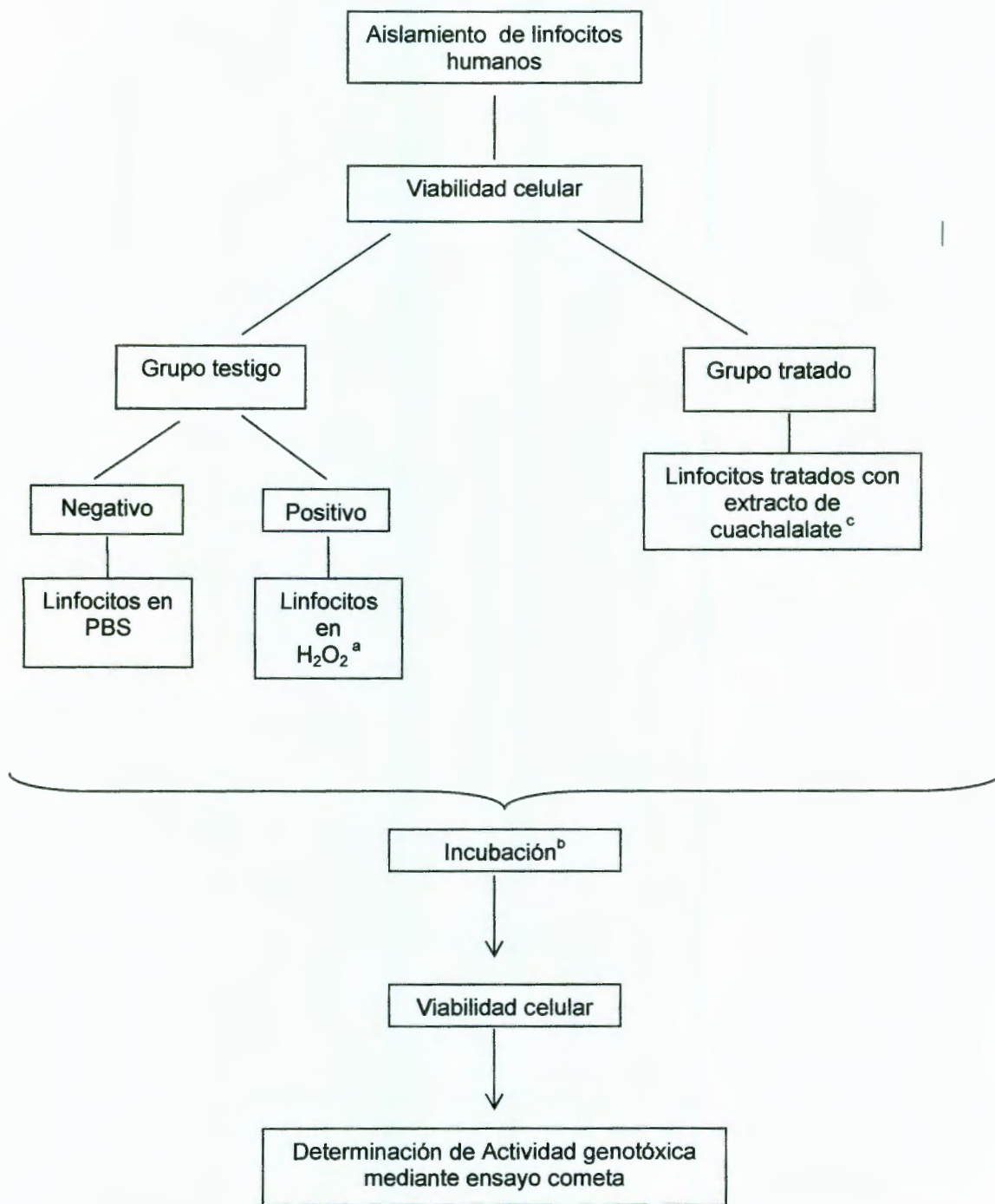
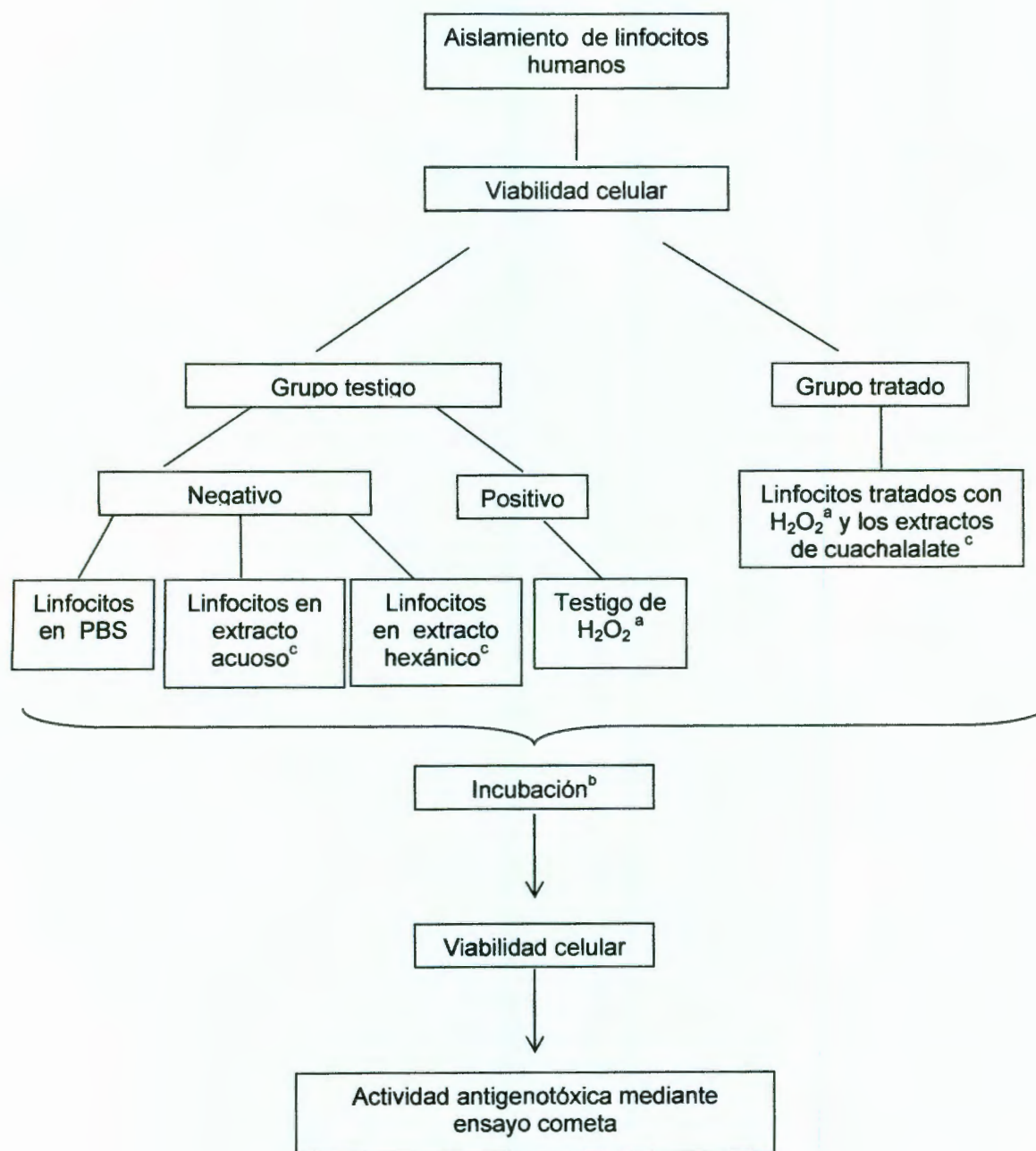


Figura 5. Diseño experimental de inducción de daño genotóxico.



<sup>a</sup> Peróxido de hidrógeno 60µM  
<sup>b</sup> Incubación durante 30, 60 y 90 min.  
<sup>c</sup> 0.02, 0.2 y 2% p/v

Figura 6. Diseño experimental para el ensayo de genotoxicidad.



<sup>a</sup> Peróxido de hidrógeno 60µM

<sup>b</sup> Incubación 30,60 y 90 min.

<sup>c</sup> Extracto 0.02, 0.08, 0.2 y 2% p/v

Figura 7. Diseño experimental para el ensayo de antigenotoxicidad.

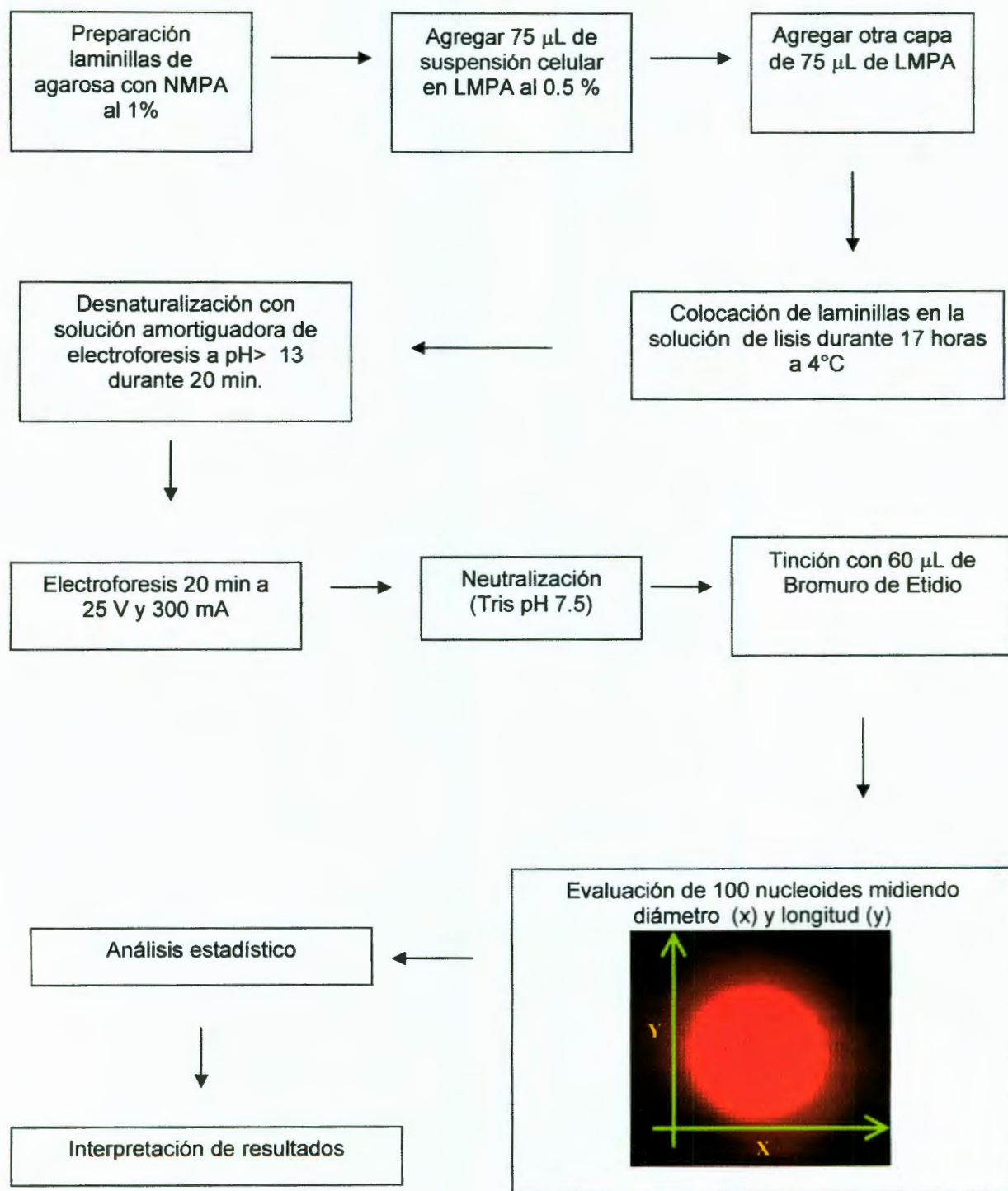


Figura 8. Diagrama de flujo para el ensayo de electroforesis unicelular.

## VI. RESULTADOS

Todos los extractos se obtuvieron a partir de una misma corteza, la cual fué analizada para comprobar que correspondiera a *Amphipterygium adstringens*. En la Figura 9 se muestra el electroferograma obtenido de una infusión de la corteza en cloroformo, donde se indica la presencia de los ácidos 3 $\alpha$ -hidroximasticadienónico y masticadienónico.

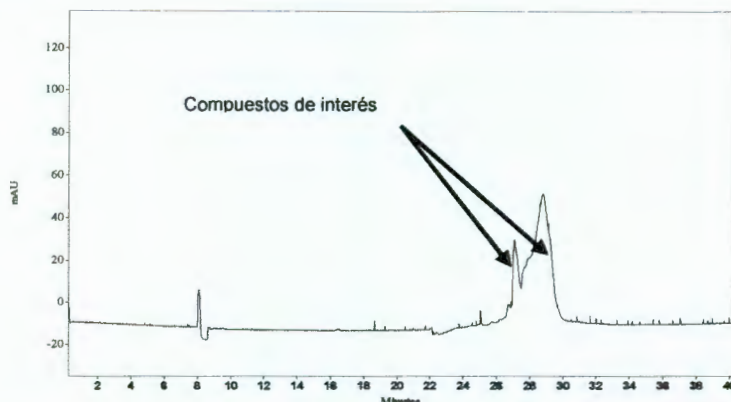


Figura 9. Electroforesis capilar (electroferograma), a partir de una infusión de cuachalalate en cloroformo. Las flechas indican la presencia de los ácidos masticadienónico (derecha) y 3 $\alpha$ -hidroximasticadienónico (izquierda).

En los estudios de genotoxicidad con el peróxido de hidrógeno, fue dependiente de la concentración utilizada, mas no del tiempo de exposición, lo cual se aprecia en la Figura 10, donde se observa que el daño producido por las concentraciones de 175 y 200  $\mu$ M fue tan grande que el ADN se fragmentó totalmente.

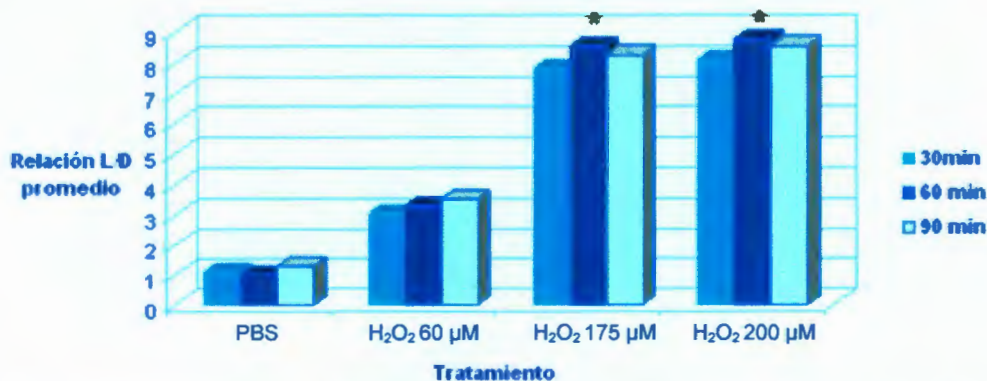


Figura 10. Inducción de daño genotóxico con peróxido de hidrógeno, Relación longitud/diámetro (L/D) promedio a las diferentes concentraciones y tiempos de incubación (\*ADN con alta fragmentación).

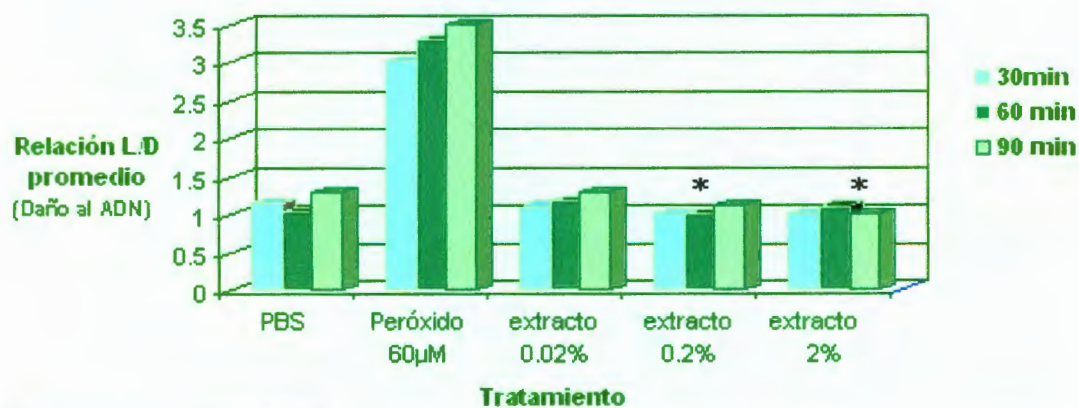
El extracto acuoso de cuachalalate fué inocuo a los linfocitos expuestos a las concentraciones estudiadas, en el Cuadro 2 se muestra como el porcentaje de viabilidad de las células expuestas al extracto es similar al obtenido con el testigo negativo y no es afectado con el tiempo de incubación. Sin embargo el peróxido de hidrógeno 60  $\mu\text{M}$  si produce disminución de la viabilidad celular.

Cuadro 2. Resultados obtenidos del porcentaje de viabilidad celular para ensayo genotóxico.

| Tiempo de incubación (min) | Viabilidad celular (%) <sup>*</sup> |  |                |               |             |
|----------------------------|-------------------------------------|--|----------------|---------------|-------------|
|                            | PBS                                 | H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 60 $\mu\text{M}$ | Extracto 0.02% | Extracto 0.2% | Extracto 2% |
| 30                         | 96                                  | 70   | 93             | 91            | 92          |
| 60                         | 95                                  | 71   | 93             | 92            | 91          |
| 90                         | 96                                  | 71   | 91             | 92            | 93          |

\* Resultados obtenidos de 3 experimentos independientes

En la Figura 11 se observa como el promedio de la relación longitud/diámetro obtenida en cada una de las concentraciones, es similar a la obtenida para el testigo negativo de PBS. A partir de la concentración de 0.2%, además de no presentarse fragmentación, los bordes de los nucleoides se observaron bien definidos.



\*Nucleoides con bordes definidos

Figura 11. Relación L/D promedio obtenido en el ensayo genotóxico.



En el ensayo antígenotóxico, la viabilidad celular disminuyó en relación directa con la concentración del extracto hexánico, en la Figura 12 se observa que esta disminución fue mayor a la del testigo positivo a partir de la concentración de 0.08%, y todavía disminuyó más al exponer los linfocitos a este extracto después de ser incubados con peróxido de hidrógeno, lo cual difiere con los resultados del extracto acuoso, donde la viabilidad celular se incrementa a medida que aumenta su concentración. Los efectos producidos en los diferentes tratamientos ensayados en el ensayo antígenotóxico, no fueron afectados por el tiempo de incubación.

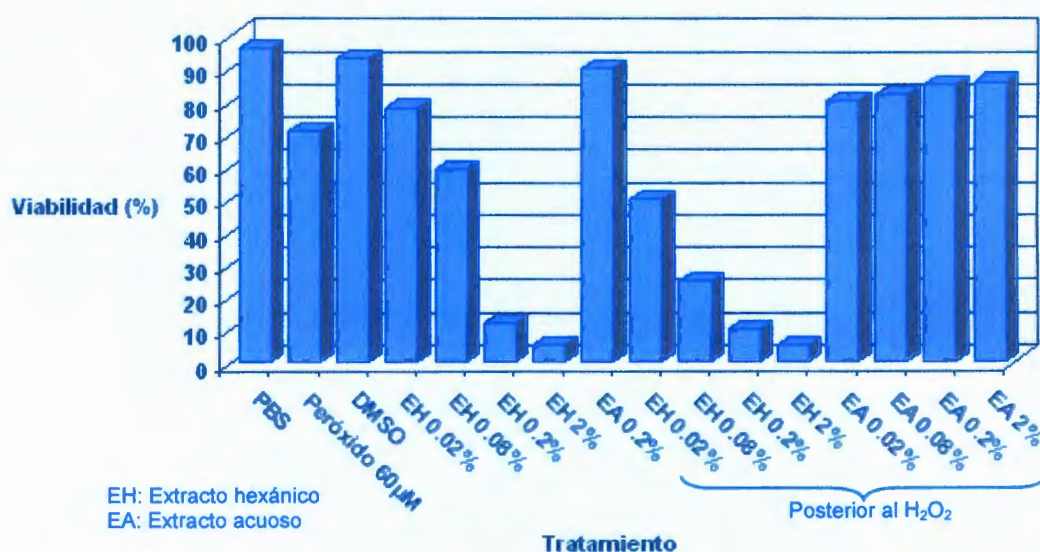


Figura 12. Porcentaje de viabilidad celular obtenido a los 60 minutos de incubación en el ensayo antígenotóxico.

Los resultados obtenidos en el ensayo antígenotóxico, indican que el extracto hexánico es genotóxico y potencia el efecto genotóxico del peróxido de hidrógeno; en la Figura 13 se observa que la relación L/D promedio del grupo tratado con este extracto después de la incubación con peróxido de hidrógeno es mayor y es dependiente de la concentración. Por el contrario, el extracto acuoso presenta una relación L/D menor a la producida por el peróxido de hidrógeno, la cual es menor a medida que aumenta la concentración del este extracto y a la concentración de 2%,

ya no se observan cometas. El porcentaje de inhibición que produce el extracto acuoso al daño genotóxico producido por el peróxido de hidrógeno se muestra en el Cuadro 3, donde se observa que a la concentración de 0.2%, el porcentaje de inhibición es considerable y a la concentración del 2% es total. En este ensayo el tiempo de incubación tampoco fue un factor importante en estos efectos.

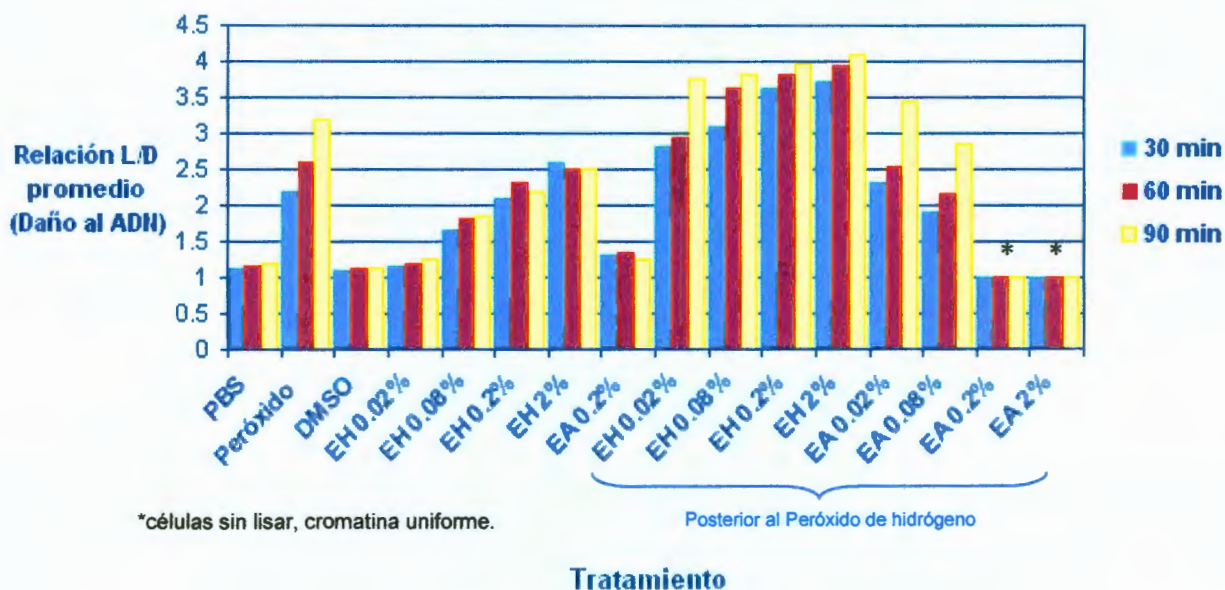


Figura 13. Relación L/D promedio obtenida para el ensayo antigenotóxico.

Cuadro 3. Porcentaje de inhibición del daño al ADN obtenido en el ensayo antigenotóxico.

| Tratamiento                      | Relación L/D | % de inhibición |
|----------------------------------|--------------|-----------------|
| Peróxido de hidrógeno 60 $\mu$ M | 2.67         | -----           |
| Extracto acuoso 0.02%            | 2.64         | 1.143           |
| Extracto acuoso 0.08%            | 2.23         | 16.41           |
| Extracto acuoso 0.2%             | 1.33         | 87.7            |
| Extracto acuoso 2%               | 1.1          | 96              |

En el Cuadro 4, se muestran los resultados del análisis estadístico realizado a los resultados obtenidos de la relación L/D del ensayo antígenotóxico, comparando los diferentes tratamientos contra el testigo negativo de PBS, donde se observa que el extracto hexánico 0.02%, el extracto acuoso 0.2% y el DMSO no mostraron diferencia estadísticamente significativa, pero el extracto hexánico partir de la concentración de 0.08% sí presenta diferencia significativa, siendo altamente significativa desde la concentración de 0.2%. Así mismo se observa que el tratamiento con el extracto acuoso posterior al peróxido de hidrógeno, a las concentraciones de 0.02 y 0.08 presentan diferencias altamente significativas con el testigo negativo, pero la diferencia entre las medias es menor que la obtenida con el testigo positivo.

Cuadro 4. Resultados del análisis estadístico de Dunnett ( $\alpha < 0.05$ ) para el ensayo antígenotóxico, comparación de la relación longitud diámetro de los tratamientos con el testigo negativo (PBS).

|                                      | Diferencia<br>entre medias | P         |
|--------------------------------------|----------------------------|-----------|
| PBS vs H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> | -1.295                     | * P<0.05  |
| PBS vs EH 0.02%                      | -0.06                      | ns P<0.05 |
| PBS vs EH 0.08%                      | -0.6940                    | * P<0.05  |
| PBS vs EH 0.2%                       | -2.645                     | **P<0.01  |
| PBS vs EH 2%                         | -3.975                     | **P<0.01  |
| PBS vs EA 0.2%                       | -0.1780                    | nsP>0.05  |
| PBS vs DMSO                          | 0.06500                    | nsP>0.05  |
| PBS vs EH 0.02% <sup>1</sup>         | -1.730                     | **P>0.01  |
| PBS vs EH 0.08% <sup>1</sup>         | -2.505                     | **P<0.01  |
| PBS vs EH 0.2% <sup>1</sup>          | -2.665                     | **P<0.01  |
| PBS vs EH 2% <sup>1</sup>            | -2.8                       | **P<0.01  |
| PBS vs EA 0.02% <sup>1</sup>         | -1.275                     | **P<0.01  |
| PBS vs EA 0.08% <sup>1</sup>         | -1.045                     | **P<0.01  |

Resultados de tres experimentos independientes.

<sup>1</sup> Tratamiento posterior a la incubación con peróxido de hidrógeno

\* Diferencia significativa

\*\* Diferencia altamente significativa

El efecto de cada uno de los tratamientos a los cuales fueron expuestos los linfocitos en el ensayo antígenotóxico, se puede observar por la forma de los nucleoides y cometas obtenidos. En la Figura 15 se observan las imágenes de los

nucleoides obtenidos por los testigos y los cometas producidos por los testigos positivos y el extracto hexánico posterior a la exposición del peróxido de hidrógeno. En la Figura 14B claramente se muestra como el DMSO a la concentración utilizada no produce un efecto genotóxico, ya que no se presenta fragmentación del ADN como en el testigo negativo de PBS (Figura 14A). En la Figura 14C se observa como los nucleoides producidos por el tratamiento con el extracto acuoso 0.2% se observan más condensados, con bordes definidos y uniformes; lo cual indica que este extracto no es genotóxico, a diferencia del extracto hexánico (Figura 14D) el cual muestra una fragmentación menor al testigo positivo (Figura 14E), pero considerable. La figura 14F muestra la fragmentación excesiva que presenta el ADN de linfocitos expuestos al extracto hexánico al 0.2% posterior al tratamiento con peróxido de hidrógeno, esta fragmentación excesiva indica que este extracto produce un daño genotóxico mayor al ADN que el producido por el peróxido de hidrógeno.

El extracto acuoso además de no presentar genotoxicidad, presenta una disminución de la fragmentación del ADN producida por el peróxido de hidrógeno, dependiente de la concentración (Figuras 15 c, d, e y f) donde además de esto se observa como las cabezas de los cometas son más condensadas, hasta que se vuelven a encontrar nucleoides como los encontrados en la exposición solamente al extracto acuoso, más condensados, con bordes definidos y uniformes. En las concentraciones de 0.2 y 2% se encontraron algunos nucleoides como los mostrados en la figura 15f en la parte inferior, los cuales parecen estar rodeados de una membrana.

Las imágenes de los nucleoides obtenidos a las concentraciones de 0.2 y 2% del extracto acuoso, son semejantes a las obtenidas de linfocitos en PBS sin lisar (Figura 15a). En estas imágenes se observa una cromatina uniforme, contrario a la cromatina de algunos nucleoides encontrados en la concentración de 0.08%, (Figura 15d, inferior) donde se observa abierta e irregular. Esto puede sugerir que la acción de reparación/protección del extracto acuoso sea dirigida a la membrana celular.

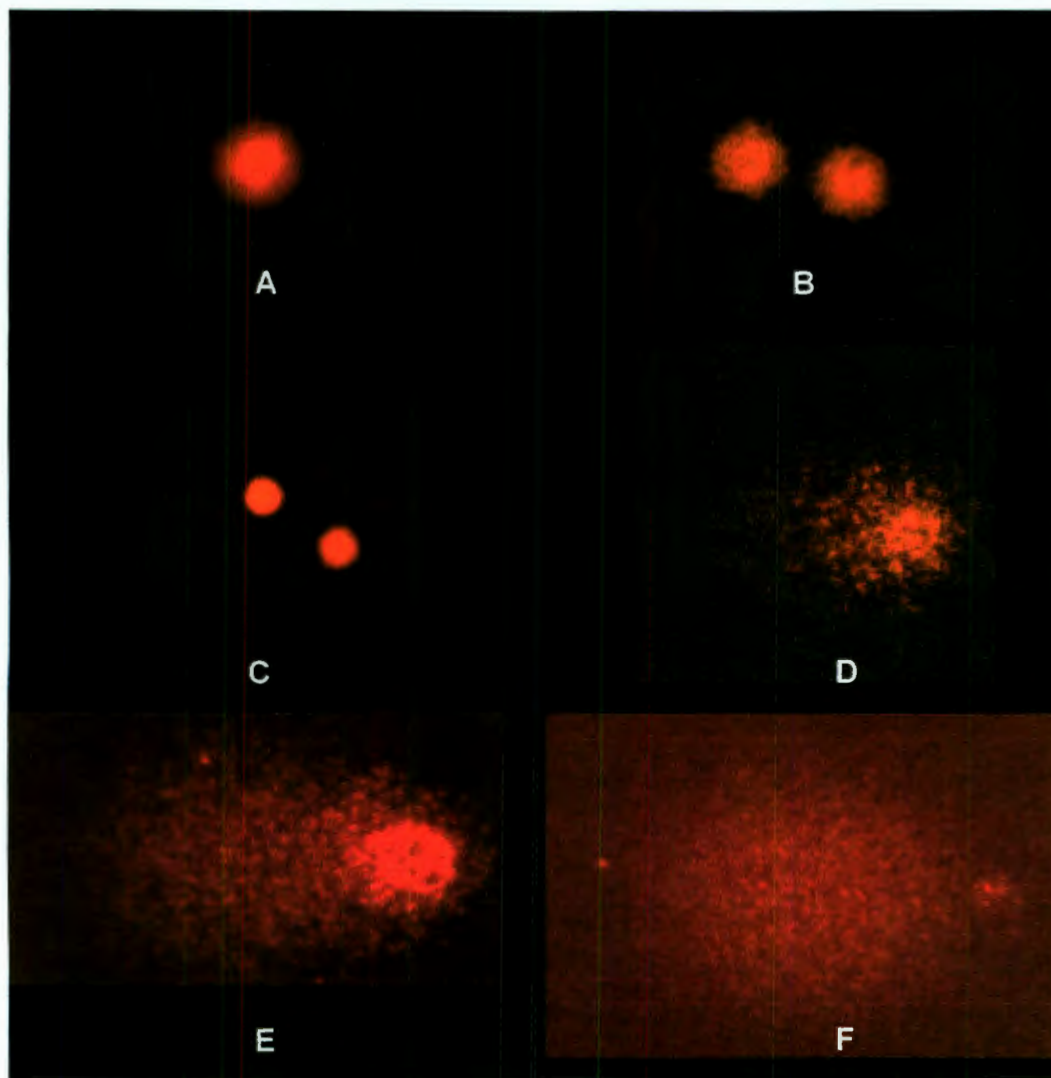


Figura 14. Imágenes del ADN de linfocitos expuestos a : **A)** PBS, **B)** DMSO, **C)** Extracto acuoso 2%, **D)** Extracto hexánico 2%, **E)** Peróxido de hidrógeno 60  $\mu$ M y **F)** Extracto hexánico 0.2% posterior a la exposición con peróxido de hidrógeno.

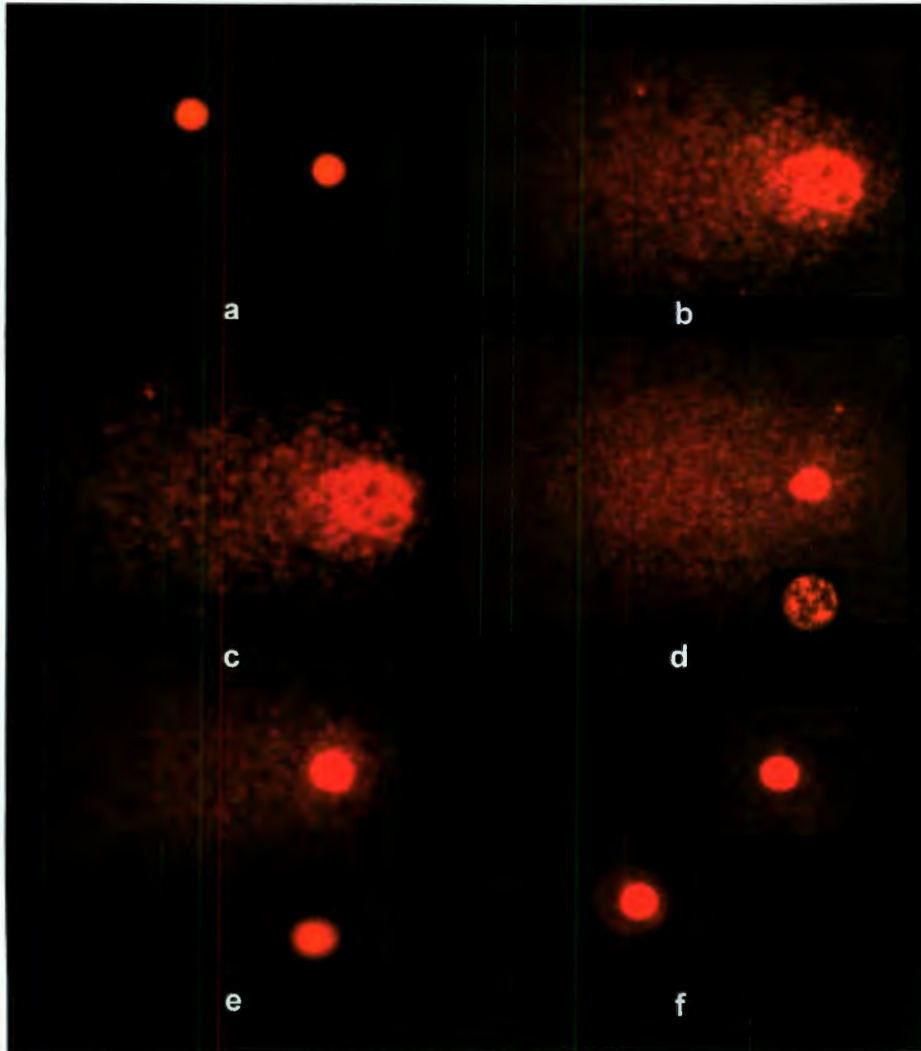


Figura 15. Imágenes del ADN de linfocitos expuestos a : a) PBS sin ser sometidos a lisis celular, b) Peróxido de hidrógeno 60  $\mu$ M c, d, e, y f) Extracto acuoso 0.02%, 0.08%, 0.2% y 2% respectivamente, posterior a la exposición con peróxido de hidrógeno, en d, la imagen inferior fue encontrada en mínima proporción (nótese la cromatina, muy abierta), en e la imagen superior fue la encontrada con mayor frecuencia y en f, la imagen inferior parece tener una membrana, esta imagen fue encontrada con menor frecuencia con respecto a la superior.

## VII. DISCUSIÓN

Con el objetivo de asegurar la autenticidad de la corteza empleada, se identificó la presencia de los ácidos masticadienónico y 3  $\alpha$ -hidroximasticadienónico (Figura 9). Estos ácidos son aislados y caracterizados por primera vez por Navarrete en 1982; más tarde, Soriano y colaboradores (1987) describen la estructura y estereoquímica del ácido masticadienónico. Finalmente Rosas (2005) en un estudio cuantitativo de la corteza de cuachalalate, reporta a los ácidos masticadienónico y 3  $\alpha$ -hidroximasticadienónico como los componentes mayoritarios de esta especie que permiten identificarla.

Para evaluar el posible efecto antigenotóxico del cuachalalate, se empleó peróxido de hidrógeno como agente genotóxico. Las especies reactivas de oxígeno, tales como peróxido de hidrógeno, aniones superóxido y radicales hidroxilo; son dañinas a las células vía estrés oxidativo. El estrés oxidativo ocurre cuando se pierde el equilibrio entre la generación de oxidantes y la actividad antioxidante del sistema, a favor de los primeros. Cuando las especies reactivas de oxígeno predominan, se acumulan en los tejidos dañando proteínas, lípidos, carbohidratos y ácidos nucleicos. El peróxido de hidrógeno es una fuente potencial de radicales  $\text{OH}^\cdot$  e induce citotoxicidad y genotoxicidad (Kanno y col., 2003), características por lo cual además se eligió como testigo positivo en este estudio. Singh y colaboradores (1988) y McKelvey-Martin y colaboradores (1993) y reportan las concentraciones de 175 y 200  $\mu\text{M}$  de peróxido de hidrógeno como testigos positivos para ensayo cometa empleando sangre completa. Sin embargo éstas concentraciones indujeron un daño genotóxico excesivo en los linfocitos aislados, obteniendo un promedio de la relación L/D entre 8 y 9 (Figura 10) y observándose cometas totalmente fragmentados, contrario a lo obtenido con la concentración de 60  $\mu\text{M}$  de peróxido de hidrógeno en la cual el promedio de la relación L/D fue entre 3 y 3.5 (Figura 10) con cometas con una fragmentación considerable y más adecuada para el estudio (Figura 14E). El contraste entre el daño inducido al ADN de los linfocitos aislados

con respecto a los contenidos en sangre completa, puede ser debido a que los linfocitos aislados se encuentran más expuestos al peróxido de hidrógeno que los no aislados, además que los eritrocitos contienen enzimas antioxidantes como la Glutathion peroxidasa y la catalasa (Usurpater y col., 2004).

La determinación de la viabilidad celular fue realizada por una prueba de exclusión que valora la citotoxicidad del compuesto de interés, por medio de la integridad de la membrana celular. El extracto acuoso de cuachalalate fue inocuo para los linfocitos a las concentraciones estudiadas, obteniéndose un porcentaje de viabilidad celular promedio entre 91 y 93%, cercano al obtenido con el testigo negativo el cual se mantuvo entre 95 y 96% (Cuadro 2). Además de esto, la viabilidad celular que resultó de la exposición de linfocitos dañados al extracto acuoso, fue de 80 a 86% (dependiente de la concentración del extracto) disminuyendo la citotoxicidad causada por el peróxido de hidrógeno (Figura 12). Oviedo-Chávez y colaboradores (2004) reportan la inocuidad del extracto acuoso la cual fue determinada en un cultivo de macrófagos peritoneales mediante la evaluación de la respiración celular (MTT assay).

Por el contrario, el extracto hexánico indujo citotoxicidad dependiente de la concentración más no del tiempo de incubación, obteniéndose desde la concentración de 0.08% un porcentaje de viabilidad celular de 59%, menor aún que el obtenido con el peróxido de hidrógeno el cual fue de 71%. La exposición al extracto hexánico de linfocitos dañados resultó en una citotoxicidad mayor a la producida por el peróxido de hidrógeno, la cual fue dependiente de la concentración de este extracto, disminuyendo la viabilidad celular a 50% a la concentración de 0.02% y hasta 5% a la concentración de 2% (Figura 12). La citotoxicidad del extracto hexánico está asociada a la presencia de una mezcla de ácidos anacárdicos, Rosas en 2005 reporta que estos ácidos se encuentran en mayor concentración en este extracto (23.14%) con respecto a los extractos metanólico (8.42%) y acuoso (2.8%); además de ser citotóxico a líneas celulares de cáncer humano. Chen y colaboradores (1998) señalan que los ácidos anacárdicos inhiben la ADN polimerasa  $\beta$ , enzima que participa en la reparación de daños en el ADN,



además de que aumenta la potencia de agentes anticancerígenos como la bleomicina y el cisplatino. Por lo cual se ha postulado que es la actividad citotóxica de los ácidos anacárdicos la que puede ser aprovechada para el combate de células cancerosas.

El extracto acuoso no fue genotóxico, ya que los cometas obtenidos presentaron una relación L/D promedio de 1.15 a 1.27 a la concentración de 0.02%, y de 1.0 a 1.2 a las concentraciones de 0.2 y 2%; valores similares a los obtenidos por el testigo negativo (Figura 11). Además este extracto disminuyó significativamente el efecto genotóxico producido por el peróxido de hidrógeno, a las concentraciones de 0.2 y 2%, donde la relación L/D disminuyó de 3.3 a prácticamente uno (1-1.2) en ambas concentraciones (Figura 13); y un porcentaje de inhibición de 87.7 y 96% respectivamente (Cuadro 3). A las concentraciones de 0.02 y 0.08%, el extracto acuoso sí mostró diferencia estadísticamente significativa con el testigo negativo, pero la diferencia entre el valor promedio de la relación L/D, fue menor a la obtenida con el testigo positivo (Cuadro 4), lo que indica que el efecto del extracto acuoso en la disminución de la genotoxicidad, es dependiente de la concentración. Este extracto además mostró producir un efecto protector en la membrana celular, ya que las imágenes de los cometas obtenidos (Figura 15e inferior y 15f superior) son semejantes a las de linfocitos en PBS sin lisar (Figura 15a). En estas imágenes se observa una cromatina uniforme, contrario a la cromatina de algunos nucleoides encontrados en la concentración de 0.08%, (Figura 15d, inferior) donde se observa abierta e irregular. El efecto del extracto acuoso en los linfocitos dañados con peróxido de hidrógeno, puede estar relacionado a las diferentes actividades gastroprotectoras que este extracto ha demostrado. En 1990, Navarrete y colaboradores reportan que el extracto acuoso de cuachalalate ejerce una actividad antiulcerosa en un modelo experimental de úlcera duodenal inducida con indometacina e histamina, aunque no modifica la secreción gástrica en ratas. Este extracto administrado por vía oral e intraperitoneal en ratas, ejerce un efecto antiulcerogástrico, inhibiendo la secreción de jugo gástrico estomacal y

contribuyendo a la más rápida cicatrización del epitelio y de la mucosa gástrica (Rosas, 2000).

Por otro lado, el extracto hexánico resultó genotóxico desde la concentración de 0.08%, ya que la relación L/D promedio obtenida por este extracto fue mayor dependiente de la concentración siendo de 1.8 para esta concentración y de 2.6 para la concentración de 2% (Figura 13), mostrando ambas concentraciones una diferencia altamente significativa con el testigo negativo (Cuadro 4). Este extracto además potencia el efecto genotóxico del peróxido de hidrógeno, ya que al tratarse los linfocitos con este extracto después del peróxido de hidrógeno, se obtuvo una relación L/D promedio mayor que la obtenida con el peróxido y con el extracto solo (Figura 13), lo cual se puede apreciar en las imágenes de los cometas obtenidos (Figura 15 D, E y F). Martínez y Flores (2003), en un estudio realizado in vivo, reportan que el extracto hexánico potencia el efecto genotóxico de ifosfamida, un antineoplásico empleado en cáncer de pulmón.

El ensayo cometa es un método que permite evaluar el daño al ADN, con aplicaciones en estudios de genotoxicidad y antigenotoxicidad, al permitir valorar tanto el daño como reparación del ADN. Lu y colaboradores (2004) evaluaron el efecto antigenotóxico de procianidinas de semillas de uva, las cuales inhibieron el efecto antigenotóxico del peróxido de hidrógeno en fibroblastos de ratón. Con este ensayo también se ha evaluado el efecto antigenotóxico de ácidos grasos de cadena corta en el daño al ADN producido por estrés oxidativo (Abrahamse y col., 1999). El ensayo cometa es altamente sensible para detectar el daño al ADN inducido por estrés oxidativo y la genotoxicidad causada por el peróxido de hidrógeno, la cual puede ser detectada antes de la muerte celular. El estrés oxidativo está implicado en la patogénesis de diferentes enfermedades degenerativas como el cáncer (Henderson y col., 1998).

Dentro de los compuestos químicos de origen botánico con actividad antiulcerosa se encuentran flavonoides, saponinas, taninos, gomas y mucílagos (Borreli e Izzo, 2000). El extracto acuoso de cuachalalate contiene taninos y una saponina

esteroidal (sarsapogenina) (González y Delgado, 1962, Navarrete y col., 1990 y Mata, 1993), los cuales pueden estar relacionados con las actividades gastroprotectoras y antiulcerogástricas de este extracto.

En este estudio, los linfocitos son sometidos a estrés oxidativo, el cual puede ser reducido por antioxidantes. Los antioxidantes son deseables ya que inhiben la peroxidación lipídica de las membranas celulares (Kanno y col., 2003). Las saponinas y taninos, tienen actividades antioxidantes. *Alpha-hederine* (una saponina) ejerce un efecto protector al daño al ADN inducido por peróxido de hidrógeno el cual puede producirse al eliminar los radicales libres o por incremento de la actividad de la catalasa (Berhow, y col., 2000). Una saponina aislada de la raíz de *Platycodon grandiflorum* (*Campanulaceae*), reduce significativamente el daño oxidativo inducido por ter-butilhidroperóxido en un cultivo de hepatocitos de ratas, neutralizando los radicales libres y protegiendo las células del estrés oxidativo (Lee y col., 2004).

El extracto acuoso de cuachalalate contiene taninos (González y Delgado, 1962, Navarrete y col., 1990 y Mata, 1993); los taninos son compuestos polifenólicos muy astringentes y amargos, cumplen con una función cicatrizante al acelerar la curación de las heridas. Los taninos juegan un papel muy importante en el ambiente, principalmente porque su interacción con agentes contaminantes modifica su toxicidad. En 2003, Labieniec y colaboradores, determinaron que los taninos (ácidos tánico, elágico y gálico) a bajas concentraciones no producen daño al ADN y disminuyen significativamente el daño en células glandulares digestivas causado por el peróxido de hidrógeno. Los ácidos tánicos producen cambios en tres tipos de macromoléculas celulares (lípidos, proteínas y ADN), incrementan la fluidez en la región interna de la bicapa lipídica de la membrana celular, pero no modifican la superficie de la membrana plasmática. Además no contribuyen a la inducción de fragmentación del ADN y producen un efecto protector contra la actividad de iones  $\text{Cu}^{2+}$  en células glandulares digestivas (Labieniec y Gabryelak, 2004).

Los ácidos tánico, gálico y el propil galato, no han mostrado toxicidad en dosis de 0.1 a 100  $\mu\text{g/ml}$ , el ácido tánico y sus compuestos relacionados producen una disminución de la fragmentación del ADN inducido por peróxido de hidrógeno en linfocitos humanos. Los resultados indican que estos compuestos pueden aumentar la resistencia de los linfocitos hacia la fragmentación del ADN inducida por peróxido de hidrógeno y mutágenos alimenticios *in vitro* (Wu y col., 2004), también los taninos obtenidos de un extracto metalónico de *Geum quellyon* una planta utilizada para el tratamiento de neuralgia dental, inflamación gástrica, entre otras; exhiben propiedades antioxidantes, expresadas por su capacidad de eliminar el radical 1,1-difenil-2-picril-hidracilo (DPPH) y el anión superóxido, inhiben la actividad de la xantina oxidasa, pueden quelar metales y proteger el ADN de alteraciones inducidas por radicales hidroxilo y óxido nítrico, en líneas celulares de cáncer humano (Russo y col., 2005). Rosas (2005) reporta que el extracto acuoso muestra una actividad antioxidante al presentar un 95% de inhibición del 2,2-difenil-picrilhidracilo (DPPH) a las concentraciones de 100 y 1000 ppm, mientras que del ácido 6-nonadecilsalicílico (un ácido anacárdico) (100 ppm), sólo fue del 8.8%.

Los extractos acuoso y hexánico de cuachalalate mostraron tener efectos totalmente diferentes en linfocitos dañados con peróxido de hidrógeno 60  $\mu\text{M}$ . Oviedo-Chávez y colaboradores (2004), observaron que el extracto hexánico presenta menor actividad antiinflamatoria produciendo un porcentaje de inhibición de 14.4% menor al producido por el extracto acuoso (73.5%).

El efecto antigenotóxico de *Amphipterygium adstringens* puede ser atribuido a los componentes de su extracto acuoso, ya que en este estudio sólo el extracto acuoso fue el que presentó inhibición del efecto genotóxico del peróxido de hidrógeno y la integridad del ADN a las concentraciones más altas; mientras que el extracto hexánico resultó genotóxico *per se* y potenció el efecto genotóxico inducido inicialmente.

## VIII. CONCLUSIONES

- La corteza con la que se realizó el estudio corresponde a *Amphipterygium adstringens*, en la cual se identificaron los ácidos masticadienónico y 3 $\alpha$ -hidroximasticadienónico; sus componentes mayoritarios.
- El extracto hexánico es genotóxico desde la concentración de 0.08% y potencia el efecto genotóxico del peróxido de hidrógeno 60  $\mu$ M en linfocitos humanos.
- El extracto acuoso es inocuo para los linfocitos humanos y ejerce un efecto antigenotóxico a todas las concentraciones estudiadas.
- El efecto antigenotóxico del cuachalalate puede ser atribuido a los componentes de su extracto acuoso.
- Posiblemente en el efecto protector del extracto acuoso, esté involucrada la membrana celular.

## IX. SUGERENCIAS

Considerando los resultados obtenidos en esta investigación se plantean las siguientes sugerencias:

- Realizar el ensayo genotóxico, posterior a la exposición de las células al extracto acuoso, para estudiar si este extracto produce un efecto quimioprotector contra el daño genotóxico que produce el peróxido de hidrógeno.
- Exponer las células de manera simultánea al extracto acuoso y al peróxido de hidrógeno, para estudiar si el extracto evita que el peróxido de hidrógeno cause daño oxidativo en las células.

## X. BIBLIOGRAFÍA

- Abrahamse, L. S., Pool-Zobel, L. B. y Rechkemmer, G. 1999.** Potencial of short Chain fatty acids to modulate the induction of DNA damage and changes in the intracellular calcium concentration by oxidative stress in isolated rat distal colon cells. *Carcinogenesis* Vol. 20 (4):629-634.
- Argueta, V. A., Cano, L., Rodarte, M. 1994.** Atlas de las plantas de medicina tradicional mexicana. Instituto indigenista. México. 542-543.
- Barcelo, J. 1982.** Diccionario terminológico de química. España. Editorial Alambra: 769.
- Benítez, Y. J. 1998.** Evaluación farmacológica del efecto gastroprotector de los triterpenoides de la corteza de cuachalalate. Tesis de Licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza. UNAM. México, D.F. 90-95.
- Betancourt, Y. 2001.** 1000 plantas medicinales y aromáticas de México. Jardín Botánico de Tlaxcala. [www.sdnf.undop.org](http://www.sdnf.undop.org)
- Berhow, M.A., Wagner, E. D., Vaughn, S. F., Plewa, M.J. 2000.** Characterization and antimutagenic activity of soybean saponins. *Mutation Research* Vol. 448 (1):11-22.
- Blasiak, J., Sikora, A., Czechowska, A. y Drzewosky, J. 2003.** Free radical scavengers can modulate the DNA-damaging action of alloxan. *Acta Biochimica Polonica*. Vol. 50 (1): 205-210
- Borrelli, F. e Izzo, A. 2000.**The plant kingdom as a source of anti-ulcer remedies. *Phytotherapy Research* 14 (8): 581-591.
- Brockman, H. E., Stack, H. F. y Waters, M. D. 1992.** Antimutagenicity profiles of some natural substances. *Mutation Research*. Vol.1: 15.
- Chen, J., Zhang, Y., Wang, L., Sucheck, S., Snow, A. y Hecht, S. 1998.** Inhibitors of DNA polymerase  $\beta$  from *Schoepfia californica*. *Chemical Communications*. Vol. 11 (5): 2769-2770
- Cho, J. A., Oh, E., Lee, E. y Donggeun, S. 2003.** Effects of hair dyeing on DNA damage in human lymphocytes. *Journal Occupation Health*. Vol. 45: 376-381.

- Collins, R. A. 2004.** The Comet Assay for DNA Damage and Repair. Principles, Applications, and Limitations. *Molecular Biotechnology* Vol. 62 (49):249-261.
- Cortinas, N. C. y Aguirre, E. J. 1990.** Cáncer y ambiente, bases epidemiológicas para su investigación y control. Modulo Carcinogénesis. Centro Panamericano de Ecología Humana y Salud, Programa de Salud Ambiental, Organización Panamericana de la Salud, Organización Mundial de la Salud. México. 33-43.
- Domínguez, R. M. 2005.** Actividad genotóxica del ácido 6-nonadecil salicílico aislado de la corteza de cuachalalate y de su éster metílico evaluada en sangre periférica de ratones CD1 con la prueba de micronúcleos. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán UNAM. Tesis para obtener el título de licenciatura en Químico Farmacéutico Biólogo.
- Fernández, R. J. 2003.** Valoración del efecto cicatrizante del cuachalalate (*Amphipterygium adstringens*) en lesiones cutáneas de rata wistar. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza UNAM. Tesis para obtener el título de licenciatura en Químico Farmacéutico Biólogo.
- Fernández, J. y Navarrete, C. 2001.** Valoración del efecto cicatrizante del cuachalalate., <http://www.depa.pqui.unam.mx>
- Gardner, J., Simmons, M. y Snustad, P. 2003.** Principios de genética. 4ª Edición, Limusa Wiley, México. 467-469.
- Giner-Larza, E. M., Mañez, S., Giner R. M., Recio, M. C., Prieto, J. M., Cerda-Nicolás, M., Ríos, L. 2002.** Anti-inflammatory triterpenes from *Pistacia terebintusgalls*. *Planta Medica* Vol. 68 (2):311-315.
- González, E., Mckenna, G. y Delgado, J. 1962.** Anticancer evaluation of *Amphipterygium adstringens*. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. Vol. 51 (9): 901-903.
- González, E. y Delgado, J. 1962.** Phytochemical Investigation of *Amphipterygium adstringens*. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. Vol. 51 (8):786-790.
- Giannotti, E., Vandin, L., Repeto, P. y Comelli, R. 2002** A comparison of the *in vitro* Comet assay with the *in vitro* chromosome aberration assay using whole human blood or Chinese hamster lung cells: validation study using a range of novel pharmaceuticals. *Mutagenesis* Vol. 60 (17): 163-170.



- Guizar, J. 1996.** Genética clínica. Diagnóstico y manejo de las enfermedades hereditarias. El Manual Moderno. México. 85-87.
- Henderson, L., Wolfreys, A., Fedyk, J., Bourner, C. y Windebank, S. 1998.** The ability of the Comet assay to discriminate between genotoxins and cytotoxins. *Mutagenesis*. Vol 62 (13):89-94.
- Hersch-Martínez, P. 1995.** Comercialization of wild medicinal plants from southwest Puebla. México. *Economical Botanica* Vol. 49 (2):197-206.
- Huerta, C. 2002.** La herbolaria: mito o realidad. <http://www.conabio.gob.mx>
- Jaiswal, M., Anuradha, G., Rajeswari, N., Raju, K.N., Balakrishna, N., Rao, K.V., Prasad, I. S., Jain, S.N. y Ahuja, Y.R. 1994.** Comet assay on cervical epithelial cells and leucocytes of patients with precancerous and cancerous lesions of the cervix. *Medical Science Research*, Vol. 22: 879-881.
- Jiménez, A. M. 2004.** Estudio de la capacidad apoptótica del cuachalalate (*Amphipterygium adstringens*) evaluada con el ensayo cometa (Electroforesis unicelular en gel). FES-Cuautitlán- Universidad Nacional Autónoma de México. Tesis para obtener el título de licenciatura en Químico Farmacéutico Biólogo.
- Kanno, S., Shouji, A., Asou, K. y Ishikawa, M. 2003.** Effects of Naringin on Hydrogen Peroxide-Induced Cytotoxicity and Apoptosis in P388 Cells. *Journal of Pharmacology Science* Vol. 92: 166 -170.
- Klaude, M., Eriksson S., Nygren J., Gunnar A. 1995.** The comet assay: mechanism and technical considerations. *Mutation Research*: Vol. 95:89-91.
- Klug, S.W. y Cummings, W.R. 1999.** Genética y Cáncer. En: *Conceptos de Genética*. Prentice may. España: 625.
- Kubota, Y., Takahashi, S., Sato, H., Suetomi, K. y Aizawa, S. 2004.** Radiation-induced Apoptosis in peritoneal resident macrophages of C3H mice. *Journal Radiation Research*. Vol. 45: 205-211
- Labieniec, M., Gabryelak, T. y Falcioni, G. 2003.** Antioxidant and pro-oxidant effects of tannins in digestive cells of the freshwater mussel *Unio tumidus*. *Mutation Research*. Vol. 539 (1-2):19-28

- Labieniec, M. y Gabryelak, T. 2004.** Response of DNA, proteins and membrane bilayer in the digestive gland cells of freshwater mussel *Unio tumidus* to tannins exposure. *Toxicol In Vitro*. 2004 Vol. 6:773-81.
- Lee, K.J., Choi, C.Y., Chung, Y.C., Kim, Y.S., Ryu, S.Y., Roh, S.H. y Jeong, H.G. 2004.** Protective effect of saponins derived from roots of *Platycodon grandiflorum* on tert-butyl hydroperoxide-induced oxidative hepatotoxicity. *Toxicology Letters*. Vol. 147(3):271-82.
- Lu, Y., Zhao, W., Chang, Z., Chen, W., Li, L. 2004.** Procyanidins from grape seeds protect phorbol ester-induced oxidative cellular and genotóxica damage. *Acta Pharmacologica Sinica* Vol. 25 (8): 1083-1089
- Macioszek, V.K. y Kononowicz, A.K. 2004.** The evaluation of the genotoxicity of two commonly used food colors: quinoline yellow (E 104) and brilliant black BN (E 151). *Cellular & Molecular Biology Letters*. Vol 9: 107-122.
- Madrigal-Bujaidar, E., Díaz-Barriga, S., Cassani, M. y Márquez, P.1998.** *In vivo* and *in vitro* antigenotoxic effect of nordihydroguaiaretic acid on the frequency of SCEs induced by methyl methanesulfonate. *Mutation Research*. Vol. 419: 163-168.
- Makino, M., Motegi, T., Fijimoto, Y. 2004.** Tirucallane-type triperpenes from *Juliana adstringens*. *Phytochemistry*. Vol 65:891-896.
- Martínez, M. 1991.** Catálogo de nombres vulgares y científicos de plantas mexicanas. Fondo de la cultura Económica. México.
- Martínez, E., y Flores, G. 2003.** Estudio de la acción anticlastogénica del cuachalalate (*Amphipterygium adstringens*.) sobre la inducción de micronúcleos producidos por ifosfamida. FES-Cuautitlán-Universidad Nacional Autónoma de México. Tesis para obtener el título de licenciatura en Químico Farmacéutico Biólogo.
- Martínez, M. 1992.** Plantas medicinales de México. 6ª Ed. Botas. México. 404-403.
- Mata, R., Calzada, F., Navarrete, A., del Rio, F. y Delgado, G. 1991.** Longchain phenols from the bark of *Amphipterygium adstringens*. *Journal of Ethnopharmacology*. Vol. 43: 147-154.

- Mata, 1993.** Chemical studies and Biological Aspects of some Mexican plants used in traditional medicine. Phytochemical potential of tropical plants. New York, USA. 41-64
- McKelvey-Martin, V.J., Green, M., Schmezer, P., deMeo. y Collins, A. 1993.** The single gel electrophoresis assay (comet assay): a European review. Mutation Research. Vol. 288: 47-63.
- Miyamae, Y., Yamamoto, M., Sasaki, Yu., Kobayashi, H., Miyuki, I.S., Shimouri, K. y Hayashi, M., 1998.** Evaluation of tissue homogenization technique the isolates nuclei for the vivo single gel electrophoresis (comet) assay: a collaborative study by five laboratories. Mutation Research. Vol. 418: 131-140.
- Navarrete, C., 1982.** Estudio Químico y pruebas farmacológicas a la corteza de *Juliana adstringens*. Ignacio Zaragoza, México D.F. Universidad Nacional Autónoma de México. Tesis para obtener el título de licenciatura en Químico Farmacéutico Biólogo.
- Navarrete, C. A. 1986.** Estudio químico de plantas usadas en medicina tradicional: Constituyentes de *Chenopodium graveolens*, *Chenopodium ambrosioides* y *Amphipterygium adstringens*. Facultad de Ciencias, UNAM. Tesis para obtener el título de maestro en ciencias. 89-96.
- Navarrete, C. A., Mata, R. y Delgado, J. 1989.** Alkylsuccinic acids from *Amphipterygium adstringens*. Planta Medica Vol. 55 :579
- Navarrete, C. A., Reyes, B., Silva, A. 1990.** Evaluación farmacológica de la actividad antiulcerosa de *Amphipterygium adstringens* (Cuachalalate). Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas Vol. 21:28-32.
- Olive, P., Banath, R. y McCoy, M. 1994.** Duracing, heterogeneity in radiation-induced DNA damage and repair in tumor and normal cell using comet assay. Radiation Research. Vol. 122: 86-94.
- Olivera, O., Martinez, V., Soto, H. y Solares, A. 1999.** Phytochemical study of cuachalalate (*Amphipterygium adstringens* Schiede ex Schelecht). Journal of Ethnopharmacology. Vol. 68: 109-113.

- Östling, O. y Johanson, K.J. 1984.** Microelectroforesis study of radiation induced DNA damages in individual cells. *Biochemistry Biophysics Research*. Vol. 123: 291-298.
- Oviedo, C. I., Ramírez, A. T. y Martínez, V. M. 2004.** Inhibición del crecimiento de células cancerosas humanas y aumento en la producción de óxido nítrico en macrófagos no activados por triterpenos del tipo tirucalano. 1º Congreso de Química Médica, Dedicado a la investigación en cáncer. Oaxaca, México.
- Oviedo-Chávez, I., Ramírez-Apan, T., Soto-Hernández, M., Martínez-Vázquez, M. 2004.** Principles of the bark of *Amphipterygium adstringens* (*Julianaceae*) with anti-inflammatory activity. *Phytomedicine* Vol. 11(5):436-445.
- Palyvoda, O., Polanska, J., Wygoda, A. y Rzeszowska-Wolny, J. 2003.** DNA damage and repair in lymphocytes of normal individuals and cancer patients: studies by the comet assay and micronucleus test. *Acta Biochimica Polonica*. Vol. 50 (1): 181-190
- Quintanar, T. M. 2005.** Inducción de intercambio de cromátidas hermanas y modificación de la cinética de proliferación celular provocada por el extracto hexánico de cuachalalate en linfocitos humanos. Facultad de estudios superiores Cuautitlán UNAM. Tesis para obtener el título de Químico Farmacéutico Biólogo.
- RHNM, 2001.** Registro Histopatológico de Neoplasias Malignas, México.
- Rosas, A. H. 2000.** Análisis fitoquímico de *Cytocarpa procera* y *Amphipterygium adstringens* Schiede ex Schlecht. Tesis de maestría Instituto de Recursos Naturales Colegio de Postgraduados, Chapingo México.
- Rosas, A. H. 2005.** Estudio químico y biológico de la corteza de *Amphipterygium adstringens* Schiede ex Schlecht. Texcoco, Estado de México. Colegio de postgraduados, Institución de enseñanza e investigación, Campus Montecillo. Tesis para obtener el grado de Doctor en Ciencias.
- Russo, A., Cardile, V., Lombardo, L., Vanella, L., Vanella, A. y Garbarino, J.A. 2005.** Antioxidant activity and antiproliferative action of methanolic extract of *Geum quellyon* Sweet roots in human tumor cell lines. *Journal of Ethnopharmacology*. Vol. 100(3):323-32.

- Rydberg, B. y Johanson, K. J. 1978.** Estimation of single strand breaks in single mammalian cells, in: P.C. Hanawalt, E. C. Friedberg, C. F. Fox (eds), DNA Repair Mechanisms, Academic Press, New York: 465-468
- Singh, N.P., McCoy M.T., Tice R.R. y Schneider E.L. 1988.** A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. Experimental Cell Research. Vol. 175: 184-191.
- Soriano, G. M., Toscano, R. A., Ortíz, B., Navarrete, A., Sánchez, A., Barrios, H. y Yuste, F. 1987.** Structure and stereochemistry of the methyl ester de (5 $\alpha$ , 13 $\alpha$ , 14 $\alpha$ , 17 $\alpha$ , 20S, 24 Z)-3 Oxolanosta-7, 24-dien-26 oic acid (Masticadienonic acid). Acta Crystallographica Vol. 43, 990-992.
- Szyfter, K., Szulc, Roman., Mikstacki, A., Stachecki, I., Rydzanicz, M. y Jaloszynski, P. 2004.** Genotoxicity of inhalation anaesthetics: DNA lesions generated by sevoflurane *in vitro* and *in vivo*. Journal of Applied Genetics. Vol. 45(3): 369-374.
- Usurpater, M., Cavanagh, M. E., Fraga, G. C., Puddú, M., Tamaroft, C., Valtuille, R. 2004.** Estrés oxidativo en pacientes en hemodiálisis. Losartan aumenta los niveles plasmáticos de Ubiquinol. Revista de Nefrología Diálisis y Transplante, Vol. 24 (3):111-118
- Vaghef, H., Nygren, P., Edling, C., Bergh, J. y Hellman B. 1997.** Alkaline single-cell gel electrophoresis and human biomonitoring for genotoxicity: a pilot study on breast cancer patients undergoing chemotherapy including cyclophosphamide. Mutation Research Vol. 395 (2-3): 127-38
- Valeminsky, J. y Gichner, T. 1988.** Mutagenicity Activity of promutagens in plants: indirect evidence of the air activation. Mutation Research. Vol. 197: 221-242.
- Valverde, M., Ostrosky-Wegman, P., Rojas, E., Fortoul, T., Meneses, F., Ramírez, M, Díaz-Barriga, F. y Cebrian, M. 1999.** The application of single cell gel electrophoresis or comet assay to human monitoring studies. Salud Publica Mex Vol. 41 (2):109-113.
- Wada, S., Khoa, T., Kobayashi, Y., Funayama, T., Yamamoto, K. y Natsuhori, M. 2003.** Detection of radiation-induced apoptosis using the comet assay. Journal Veterinary Medical Science. Vol. 65 (11): 1161-1166.

- Waters, M. D., Brady, A. L., Stack, H. F. y Brockman, H. E. 1990.** Antimutagenicity profiles for some model compounds. *Mutation Research*. Vol. 238: 57-85.
- Woźniak, K. y Błasiak, J. 2004.** Nickel impairs the repair of UV-and Damaged DNA. *Cellular and Molecular Biology Letters*. Vol. 9: 83-94.
- Wu, M., Ping, H.F.y Fiher, D., 2003.** Apoptosis: Molecular mechanisms. *Enciclopedia of life Sciences* <http://www.els.net/els>
- Wu, L.T., Chu, C.C., Chung, J.G., Chen, C.H., Hsu, L.S., Liu, J.K., Chen, S.C. 2004.** Effects of tannic acid and its related compounds on food mutagens or hydrogen peroxide-induced DNA strands breaks in human lymphocytes. *Mutation Res*. Vol. 556 (1-2):75-82.
- Zamora, T. P. 2003.** Evaluación del aprovechamiento potencial del cuachalalate (*Amphipterygium adstringens*, Schiede ex Schlecht) en San Juan Bautista Jayacatlan Oaxaca. Tesis de licenciatura. Facultad de Ciencias-UNAM.