



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLÁN

"ESTUDIO GENOTÓXICO DEL ÁCIDO
NORDIHIROGUAYARETICO SOBRE CULTIVO
DE LINFOCITOS HUMANOS"

T E S I S
FALLA DE ORIGEN

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA
P R E S E N T A :
GABRIELA PONCE ANGUIANO

DIRECTOR DE TESIS: M. en C. SANDRA DIAZ-BARRIGA A.

CO-DIRECTOR: DR. EDUARDO MADRIGAL B.



CUAUTITLÁN IZCALLI, EDO. DE MÉXICO

1995



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN
UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR

DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES N. A. M.
FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES CUAUTITLAN

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS



DR. JAIME KELLER TORRES
DIRECTOR DE LA FEB-CUAUTITLAN
P R E S E N T E .

AT'N: Ing. Rafael Rodríguez Ceballos
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la F.E.S. - C.

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el trabajo "Estudio Genotóxico del Acido Nordihidroguayaráctico sobre cultivo de linfocitos humanos".

que presenta la pasante: Gabriela Ponce Anquiano
con número de cuenta: 8418146-0 para obtener el TITULO de:
Química Farmacéutica Bióloga.

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

A T E N T A M E N T E .

"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cuatitlán Izcalli, Edo. de Mex., a _____ de _____ de 199__

PRESIDENTE	<u>Q.F.E. Leticia Zuriga Ramirez</u>	<i>Leticia Zuriga Ramirez</i>
VOCAL	<u>Q.F.B. Ma. Esther Revuelta Miranda</u>	<i>Esther Revuelta Miranda</i>
SECRETARIO	<u>M. en C. Sandra Díaz Barrica Arceo</u>	<i>Sandra Díaz Barrica Arceo</i>
1er. SUPLENTE	<u>Q.F.B. Virginia Oliva Arellano</u>	<i>Virginia Oliva Arellano</i>
2do. SUPLENTE	<u>Q.F.B. Rosalba Bonilla Sánchez</u>	<i>Rosalba Bonilla Sánchez</i>

DEDICATORIAS.

A ti Señor DIOS Todo Poderoso.

Porque tu fidelidad es grande, porque siempre me ayudaste y me sustentaste . Isaías 41:10

A mis padres.

Guadalupe Anguiano Flores.

Othón Ponce Gama.

Por su amor incondicional, por su apoyo y consejos,
por su sacrificio personal para poder realizar mis estudios y alcanzar esta meta.

A mis hermanos.

Carmen, Mónica, Judith y Luis.

Por su cariño y apoyo.

A mis sobrinos.

Isaac y al pequeño bebé.

Porque al mirarme con sus tiernos ojos y regalarme sus maravillosas sonrisas me llenan de gozo y me animan a seguir adelante.

A todos mis amigos y compañeros de la 14 ava.
generación de Q.F.B.

Porque juntos hemos compartido alegrías, travesuras,
proyectos, e incluso problemas y porque me brindaron
su amistad y su apoyo sincero.

A mis amigas Sara y Guadalupe por la maravillosa
amistad que nos une.

A mis amigas Abeda y Sandy por el lazo
tan especial que nos une y por ese apoyo
y ánimo que me brindan.

A las familias Ponce Gama y Anguiano Flores.

AGRADECIMIENTOS .

A los profesores:

M. en C. Sandra Díaz Barriga Arceo

Dr. Eduardo Madrigal Bujaidar.

Q.B.P. Martha Casarri.

Por su gran ayuda.

A mis compañeros y amigos del laboratorio
de Genética.

Cristina, Norma, Leo, Amina, Norma,

y Gabriel.

Por su amistad y apoyo.

A la señora Silvia y a Roberto.

A mis profesores.

A mis sinodales.

A la Universidad Nacional Autónoma de México.

A todas las personas que contribuyeron para la
realización de este trabajo.

El presente trabajo: Estudio genotóxico del ácido Nordihidroguayarético sobre cultivo de linfocitos humanos, fue realizado en el laboratorio de Genética de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán UNAM y en el laboratorio de Genética del departamento de Morfología de la E.N.C.B. del IPN, bajo la dirección de la M. en C. Sandra Díaz-Barriga Arceo y la co-dirección del Dr. Eduardo Madrigal Bajaidar.

INDICE GENERAL.

	pág.
Indice general	i
Indice de tablas y figuras.....	ii
Resumen	1
1. Introducción	3
1.1. Mutación y Carcinogénesis.....	3
1.1.2. Mutaciones somáticas y cáncer	5
1.1.3. Carcinogénesis.....	6
1.2 Antimutógenos	9
1.2.1. Definición	9
1.2.2. Clasificación	9
1.3. Peroxidación de lípidos	13
1.3.1. Lípidos.....	13
1.3.2. Ácidos grasos	14
1.3.3. Oxidación de lípidos.	17
1.3.3.1. Química de la peroxidación de lípidos	18
1.3.3.2. Reacciones de la peroxidación de lípidos	20
1.4. Antioxidantes	27
1.4.1. Mecanismo de acción	27
1.4.2. Antioxidantes naturales.....	28
1.4.2. Antioxidantes sintéticos	32

1.5.	Compuestos fenólicos y lignanos	34
1.5.1.	Compuestos fenólicos	34
1.5.2.	Lignanos	35
1.5.2.1..	Actividad biológica de los lignanos	36
1.6.	Características del Acido Nordihidroguayarético	39
1.7.	Sistemas de prueba	42
2.	Objetivos	46
3.	Material y Métodos	47
3.1.	Material	47
3.1.1.	Material biológico	47
3.1.2.	Reactivos	47
3.2.	Procedimiento experimental	47
4.	Resultados	54
5.	Discusion	62
6.	Conclusiones	67
7.	Referencias	68

INDICE DE TABLAS Y FIGURAS.

	página.
Tabla 1. Clasificación de antimitógenos y sus mecanismos inhibidores.	12
Tabla 2. Relación de compuestos con actividad antitumoral.	38
Figura 1. Principales ácidos grasos poliinsaturados presentes en las membranas de la fracción microsomal del hígado de rata.	15
Figura 2. Mecanismo de la peroxidación de lípidos.	
Figura 3. Reacción en cadena de la peroxidación de lípidos.....	19
Figura 4. Fuentes celulares de radicales libres.	23
Figura 5. Mecanismo mediante el cual los radicales libres producen daño a las células.	24
Figura 6. Antioxidantes biológicos. Sistemas de defensa.	31
Figura 7. Estructuras químicas de los principales antioxidantes sintéticos.	33
Figura 8. Estructura química del ácido Nordihidroguayaretico (NDGA).....	
Figura 9. Metafase de segunda división en la cual se aprecia el intercambio entre cromátides hermanas.	44
Figura 10. Procedimiento experimental esquematizado.	53

Figura 11.	Resultados del estudio genotóxico del NDGA en cultivo de linfocitos humanos del donador 1.....	57
Figura 12.	Resultados del estudio genotóxico del NDGA en cultivo de linfocitos humanos del donador 2.....	58
Figura 13.	Gráfica que muestra la relación entre los diferentes dosis del NDGA y el promedio de ICHs en ambos donadores.	59
Figura 14.	Cinética de proliferación celular del NDGA correspondiente al donador 1.....	60
Figura 15.	Cinética de proliferación celular del NDGA correspondiente al donador 2.....	61.

RESUMEN.

En los sistemas biológicos el daño oxidativo puede ocurrir debido a la presencia de altos niveles de superóxidos, radicales hidróxilo libres y peróxidos de hidrógeno, los cuales pueden oxidar moléculas blanco en las células vivas.

Los agentes protectores para este tipo de daño que han sido más estudiados son los antioxidantes como las vitaminas E, C y A, y numerosos compuestos polifenólicos, ya que estos compuestos "limpian" directamente de reactivos oxidantes. El ácido Nordihidroguayaretico es un polifenol que se encuentra en forma natural como exudado resinoso de muchas plantas, principalmente en las especies de *Guaiacum officinale*, *Guaiacum sanctum*, y de *Larrea divaricata*. Debido a sus propiedades físico-químicas se utiliza como antioxidante de grasas animales, aceites vegetales y de productos lácteos, también entre sus propiedades se descubrió que es un efectivo antimutágeno en el sistema de Ames contra sustancias tan variadas como la aflatoxina B1, el benzo(a)pireno y el metilmetanosulfonato, y como agente antitumoral en ratas SENCAR.

En el presente estudio se evaluó el grado de genotoxicidad de esta sustancia en cultivos de linfocitos humanos provenientes

de dos donadores distintos, a diferentes concentraciones del ácido (0.0, 1.1, 3.6, 6.7, 13.5 y 27.0 μM) evaluándose la frecuencia del intercambio entre cromátides hermanas (ICH). Los resultados muestran que en ambos donadores se vió un aumento en la frecuencia de ICHs en relación a la concentración empleada, y no existieron diferencias en la respuesta a la acción del ácido Nordihidroguayarético.

I N T R O D U C C I O N .

1. INTRODUCCION.

1.1. MUTACIONES Y CARCINOGENESIS.

Como sabemos, todos estamos expuestos a una gran variedad de agentes químicos que pueden dañar de manera severa nuestra salud. (21,44) Entre estas sustancias perjudiciales, tenemos aquellas que provocan daño al material genético, y que por lo tanto, sus efectos pueden no solo dañar a un individuo, sino también a su descendencia. A estas sustancias se les conoce como sustancias mutagénicas.

Las mutaciones son cambios producidos en el almacén de información genética, en el Acido Desoxirribonucleico (ADN) de las células. (29)

Son varios los tipos de mutaciones. Algunas involucran cambios bien definidos de una sola base en la molécula de ADN y, otros consisten en supresiones o duplicaciones de un pequeño o un gran número de nucleótidos. Así, el término mutación en este amplio sentido incluye cambios o supresión de nucleótidos únicos dentro de un gene (mutación de punto o génica) o grandes anomalías cromosómicas, las cuales pueden ser observadas bajo el microscopio. (26)

Las consecuencias genéticas de una mutación dependen del tipo de célula que es afectada. El efecto de una mutación somática puede estar limitada al individuo en el cual ésta ha ocurrido, mientras que una mutación en una célula germinal puede ser transferida a la descendencia. (26.29)

Una mutación somática puede en algunos casos, conducir a la muerte de la célula en la cual ésta ha ocurrido. En otros casos la célula sobrevive y si ésta continúa dividiéndose, se formará una clona de células mutantes. Esta clona puede ser inocua o ejercer un efecto negativo sobre el individuo, por ejemplo, si la mutación implica una transformación maligna de las células. (26.29)

La Genotoxicología estudia en forma sistemática el efecto potencial adverso de los factores ambientales en el material genético de los seres vivos. Estos factores incluyen: radiaciones, drogas terapéuticas, compuestos de uso industrial; compuestos de origen natural; fertilizantes y pesticidas; radicales libres endógenos; iones metálicos; etc. (11.32)

La interacción de los agentes genotóxicos con el ácido desoxirribonucleico (ADN) puede tener resultados muy variados por ejemplo rupturas, modificación de las bases que lo constituyen, enlaces cruzados con otras moléculas, etc. Estas

lesiones pueden producir cambios en la estructura de los cromosomas o la creación de micronúcleos en las células; así mismo, pueden causar mutaciones o que las células se hagan malignas. (25,26)

1.1.2. MUTACIONES SOMÁTICAS Y CÁNCER.

Aunque la evidencia directa del origen mutacional de las enfermedades somáticas en el hombre es limitado, las inferencias de resultados experimentales sobre otros organismos representan un fuerte apoyo para considerar que algunas enfermedades verdaderamente tienen su raíz en las mutaciones. Esto es particularmente verdadero para la relación entre mutaciones somáticas y cáncer; en donde en primer lugar el análisis de la activación de oncogenes, a indicado fuertemente que alteraciones específicas del ADN y de los cromosomas están involucrados íntimamente con procesos carcinogénicos. Datos experimentales sobre mutagénesis química y carcinogénesis conducen a la consideración de que factores mutagénicos son importantes en carcinogénesis. (7,29,42)

Estas circunstancias sugieren que ciertos cánceres humanos pueden ser prevenidos por la identificación de agentes mutagénicos en el ambiente, y protegiendo a la humanidad de la exposición a dichos agentes. Las sustancias químicas peligrosas

no se encuentran en forma individual en el ambiente, a menudo se encuentran en combinación con otros químicos y otros agentes, los cuales pueden activar o inhibir efectos mutagénicos y carcinogénicos. (37) Estas interacciones son de importancia, ya que la inducción química de mutaciones es precedida por una serie de eventos que involucran biotransformación y formación de metabolitos reactivos, estos pueden reaccionar con el ADN, con los mecanismos de reparación del ADN e influir en la selección de células iniciadas. Los diferentes agentes químicos pueden actuar sobre diferentes sitios específicos en este proceso y pueden inducir o inhibir la mutagenicidad. (22,40,42)

1.1.3. CARCINOGENESIS.

El cáncer se caracteriza por una multiplicación celular anormal, (47) mientras que la multiplicación de las células normales está regulada por mecanismos de control muy estrictos. Se ha comprobado que el crecimiento equilibrado y la división de las células normales depende en gran parte de la presencia en el medio extracelular de ciertas sustancias, casi siempre proteínas de bajo peso molecular, que reciben el nombre genérico de "factores de crecimiento". En cambio, en las células cancerosas los sistemas de control del ciclo celular se han relajado, hasta el punto de hacerse independientes de los factores de crecimiento normales en muchas ocasiones. (4,45)

Los factores de crecimiento actúan desde el exterior de la célula e interactúan directamente con componentes estructurales de la membrana celular (los llamados "receptores"). El mensaje bioquímico transmitido por un factor de crecimiento lo transfiere el receptor hacia el interior de la célula. La señal bioquímica pasa luego a través de uno o varios transmisores intracelulares y provoca la adecuada respuesta celular. (4.45)

Los cánceres humanos comienzan por la acción de oncogenes, versiones alteradas de genes normales (proto-oncogenes). A veces un oncogén se activa tras sufrir una "mutación puntual": se altera un pequeño segmento del gen al recibir radiación (electromagnética: rayos X y rayos gamma, y radiación por partículas subatómicas: electrones, protones, neutrones y partículas alfa), o al actuar sobre él un carcinógeno químico. (45)

El mecanismo de carcinogénesis involucra procesos muy complejos. La carcinogénesis química puede ser subdividida como mínimo dentro de dos etapas, la de iniciación y la de promoción. En la etapa de iniciación, un carcinógeno es ligado al ADN formándose un aducto ADN-carcinógeno y como consecuencia una alteración en el genoma. La etapa de promoción incluye una o más exposiciones al mismo iniciador o aún a sustancias no relacionadas llamadas "promotores" que completan la conversión

de una célula al estado neoplásico. (22,36) Entre los promotores más conocidos se encuentran: el peróxido de hidrógeno; el plomo y el cadmio; los esteroides de forbol; asbestos; peróxidos; el fenobarbital y la radiación ionizante. (3)

Se ha postulado que ciertos promotores de carcinogénesis actúan generando radicales oxígeno y como consecuencia la peroxidación de lípidos. La peroxidación de lípidos afecta todos los aspectos de la organización celular, incluyendo la membrana, la estructura superficial y el aparato mitótico. Los promotores también causan formación de las hormonas peróxido de la familia de las prostaglandinas y leucotrienos por la oxidación del ácido araquidónico y otros ácidos grasos poliinsaturados (C_{18}). Estas hormonas inicialmente están involucradas en la división celular, diferenciación y crecimiento tumoral. Se ha sugerido que los efectos sobre la membrana celular son el factor importante en la promoción causando inhibición de la comunicación intracelular. Los inhibidores de este proceso parecen ser los agentes antipromotores. (27)

1.2. ANTIMUTAGENOS.

1.2.1. Definición.

A las sustancias capaces de contrarrestar el daño mutagénico independientemente de los mecanismos involucrados se les conoce como "antimutagenos". Estos pertenecen a una gran variedad de familias químicas, como son los fenoles, tocoferoles, ácidos grasos, tioles y proteínas. La mayor parte de estos compuestos se han aislado de diversos vegetales incluyendo frutas comestibles que se consumen en la dieta diaria. (3,51)

1.2.2. Clasificación.

Los antimutagenos pueden ser clasificados de acuerdo a su mecanismo de acción o a la etapa durante la cual ellos ejercen sus efectos protectores. Tabla 1.

Kada y colaboradores han designado a los antimutagenos que actúan antes de la reacción de un mutágeno con el ADN como "desmutagenos". Estos incluyen factores que química o enzimáticamente inactivan compuestos mutagénicos: 1) compuestos de alto peso molecular, tales como fibras que adsorben mutágenos, 2) inhibidores de la acción metabólica de mutágenos y, 3) agentes que interfieren con la producción de mutágenos a partir de sus precursores químicos. En la mayoría de los casos, la inhibición puede ocurrir fuera de la célula, pero algunas

acciones inhibitorias sobre la activación metabólica de mutágenos pueden ocurrir en el interior de la célula blanco. Aunado al término desmutágeno, estos investigadores propusieron emplear el término " bioantimutágeno" para los factores antimutagénicos que reducen la frecuencia de mutaciones al modular los procesos de mutagénesis celular después de que el ADN ha sido dañado por mutágenos. (10,42,54)

Ramel y colaboradores también clasificaron a los inhibidores de mutagenesis de acuerdo a la etapa durante la cual ejercen sus efectos protectores: la etapa I comprende a los inhibidores que actúan extracelularmente y la etapa II incluye a los agentes que actúan intracelularmente.

La etapa I incluye a los inhibidores que impiden el daño al ADN al inactivar a mutagenos exógenos directamente, o al prevenir la formación de químicos genotóxicos de compuestos precursores. Otra clase de inhibidores de etapa I previenen la formación de mutagenos o precursores mutagénicos dentro de la célula. Dentro de la etapa II se encuentra un grupo de inhibidores llamados "agentes bloqueadores". Estos agentes impiden que compuestos genotóxicos alcancen sitios blanco críticos en la célula, ejerciendo así una función de barrera, eliminando a los compuestos genotóxicos. Otro grupo de inhibidores actúa a nivel de replicación y reparación del ADN. (3,10,42,54)

Finalmente, un grupo de inhibidores específicamente de carcinogénesis, ha sido llamado "agentes supresores". Estos agentes actúan después de que los compuestos genotóxicos han atacado sitios blanco críticos. Un ejemplo de dicha acción es la supresión de la expresión neoplásica de células, las cuales de otra manera podrían convertirse en malignas. (42, 54)

Clasificación

Ejemplos

1. Inhibidores de ontogenia que actúan extracelularmente	
1.1 Inhibiendo la formación endógena de ontogenos	
• Inhibiendo la reacción de nitrosación	Ácido ascórbico, tiazofurales, fenoles.
• Modificando la flora microbiana intestinal	Productos lácteos fermentados.
1.2. Inactivando ontogenos.	
• Por reacción química	Tiololes, antióxidantes.
• Por reacción enzimática	Vegetales con actividad de peroxidasa
2. Inhibidores de ontogenia que actúan intracelularmente.	
2.1. Moduladores del metabolismo.	
• Inhibidores de replicación celular	Retinoides.
• Inductores de mecanismos detoxificantes	Fenoles, tiololes.
2.2. Bloqueadores de moléculas reactivas.	
2.2.1. Reacción con electrófilos	Compuestos de azufre.
2.2.2. Atrapadores de especies reactivas de oxígeno	Una variedad de antióxidantes.
2.2.3. Protectores de sitios nucleofílicos del ADN	Ácido elágico, retinoides.
2.3. Moduladores de la replicación o reparación del ADN.	
• Incrementando la fidelidad de la replicación del ADN	Cloruro de cobalto.
• Favoreciendo la reparación del daño al ADN	Cisplatinado, curarina, tiololes.
3. Inhibidores que actúan sobre células iniciadas o neoplásicas.	
3.1. Moduladores de la promoción tumoral.	
• Inhibidores de efectos genotóxicos	Verde 1 y 2.
• Atrapadores de radicales libres	Una variedad de antióxidantes.
• Inhibidores de proliferación celular	Retinoides, glucocorticoides, hipertermia.
• Inductores de la diferenciación celular	Retinoides, glucocorticoides, calcio, vitamina D ₃ .
• Moduladores de la señal de transducción	Inhibidores de la proteína-C-quinasa
3.2 Moduladores de la progresión tumoral.	
• Inhibidores de efectos genotóxicos	Verde 1 y 2.
• Actuando sobre hormonas o factores de crecimiento.	Tratamientos hormonales, antagonistas de dopamina, inhibidores de proteasas.
• Actuando sobre el sistema inmune	Inmunoreguladores (retinoides), vacunas, anticuerpos monoclonales.
• Agentes antineoplásicos: fílicos, quínicos o biogénicos	Radición, drogas antibióticas, interferón.
• Moduladores de la señal de transducción	Inhibidores de la proteína-C-quinasa

Tabla 1. Clasificación de anti-ontogenos y sus mecanismos inhibidores.

1.3. PEROXIDACION DE LIPIDOS.

En los sistemas biológicos el daño oxidativo puede ocurrir debido a la presencia de altos niveles de superóxidos, radicales hidróxilo libres y peróxido de hidrógeno, los cuales pueden oxidar moléculas blancas en las células vivas. Estos radicales inician el proceso de peroxidación de las membranas lipídicas y reaccionan también con el ADN, causando modificaciones a la estructura molecular del material genético.

1.3.1. LIPIDOS.

Los lípidos son un grupo de compuestos de estructura heterogénea muy abundantes en la naturaleza, del que las grasas y aceites son los representantes más importantes. Están formados por carbono, oxígeno e hidrógeno y en ciertos casos también pueden contener fósforo y nitrógeno. Dentro de los compuestos clasificados como lípidos existe una gran variedad de sustancias que presentan poca similitud en su estructura química, pero todos tienen la particularidad de que son solubles en disolventes orgánicos e insolubles en agua. La distinción genérica que existe entre un aceite y una grasa es que los aceites son líquidos a temperatura ambiente, mientras que las grasas son sólidas. Normalmente, los aceites son de origen vegetal (soya, algodón, cacahuate, cártamo, ajonjolí, etc.), mientras que las grasas son de origen animal (cerdo, oveja, etc.)

1.3.2. ACIDOS GRASOS.

Los ácidos grasos son los componentes más abundantes de los lípidos, aunque generalmente no se encuentran en estado libre como tales, sino en forma esterificada como parte constituyente de los diferentes acilglicéridos.

Los ácidos grasos son componentes vitales del cuerpo humano y generalmente son ingeridos en la forma de triacilglicéridos, proporcionan un importante almacén de energía en el cuerpo en forma compacta, pero también juegan un papel primordial en la estructura y función de la membrana celular, ya que ellos son el sustrato de varias reacciones que conducen a la producción de sustancias con efectos fisiológicos muy activos como los eicosanoides. (52) Figura 1.

Los ácidos grasos naturales son ácidos monocarboxílicos dispuestos en cadenas por lo regular sin ramificar. Se diferencian por la longitud de la cadena y por la ausencia o presencia de dobles enlaces entre los átomos de carbono; contienen normalmente un número par de átomos de carbono ya que su metabolismo y aprovechamiento biológico se lleva a cabo a través de moléculas de carbonos pares, como es la acetil coenzima A. Sin embargo, también existen ácidos grasos con un número impar de átomos de carbono, pero se encuentran en concentraciones muy bajas en grasas animales y vegetales.



17 % Ac. Araquidónico



10 % Ac. Linoleico



5 % Ac. Docosahexaenico



5 % Ac. Linolenico

Figura 1. Principales ácidos grasos poliinsaturados presentes en las membranas de la fracción microsomal del hígado de rata. (17)

La presencia o ausencia de dobles enlaces en las moléculas son características de ácidos grasos insaturados o saturados respectivamente. Los enlaces dobles de las cadenas de ácidos grasos son muy vulnerables a la reacción con agentes oxidantes.

(33)

Los ácidos grasos eicosanoides son los componentes mayores de los lípidos estructurales de la membrana celular.(52)

1.3.3. ESTRUCTURA DE LA MEMBRANA CELULAR.

Todas las células están rodeadas por una delgada capa (de 75 a 95 Å , o 0.0075 a 0.0095 um. de grueso) de lípidos y proteínas, llamada membrana plasmática o simplemente membrana celular. Los lípidos de membrana son moléculas que contienen una parte hidrofílica y otra hidrofóbica. En medios acuosos, estos lípidos forman espontáneamente láminas bimoleculares cerradas. Estas bicapas lipídicas constituyen obstáculos al flujo de moléculas polares. Los tres tipos principales de lípidos de membrana son los fosfolípidos, los glicolípidos y el colesterol. (48)

Ciertas proteínas específicas son mediadoras de funciones características de las membranas. Las proteínas se utilizan como bombas, compuertas, receptores, transductores de energía y enzimas. Las proteínas de membrana están intercaladas en las

bicapas lipídicas, las cuales crean un ambiente adecuado para la acción de estas proteínas. Las membranas son estructuras fluidas. Las moléculas de lípidos difunden rápidamente en el plano de la membrana igual que las proteínas, a menos que estén ancladas por interacciones específicas. (48)

1.3.4. OXIDACION DE LIPIDOS.

El oxígeno molecular representa alrededor del 20 % de la atmósfera terrestre, y actúa como oxidante terminal durante la respiración, la cual es la principal fuente de energía en organismos aerobios. (18) El metabolismo del oxígeno produce radicales libres, aldehídos y un amplio rango de peróxidos que son altamente tóxicos. Las especies reactivas del oxígeno son generadas como productos metabólicos, por ejemplo, en la vía de la lipooxigenasa y ciclooxigenasa y durante reacciones catalizadas por la enzima xantina-oxidasa y por el citocromo P-450. (18)

Las formas principales de oxígeno reactivo son: el ion superóxido O_2^- ; el radical hidroperóxido HQ ; el radical hidróxilo OH^- ; y el peróxido de hidrógeno H_2O_2 . Un radical es una molécula que contiene un electrón impar. (5,21). Los radicales son generados normalmente en muchas vías metabólicas.

Algunos de estos radicales pueden existir en una forma libre y posteriormente interactuar con varios componentes tisulares resultando en disfunción. (2 2 . 3 9)

Las reacciones de oxidación de los lípidos tienen diversos orígenes. el principal es la acción directa del oxígeno sobre las dobles ligaduras de los ácidos grasos poliinsaturados. con la consecuente producción de hidroperóxidos.

1.3.4.1. Química de la peroxidación de lípidos.

La fluidez de los lípidos le confiere diversas propiedades a las membranas las cuales son esenciales para el correcto funcionamiento de la célula. Una membrana fluida es necesaria para: 1) la eficiente difusión del agua. 2) el funcionamiento de las proteínas unidas a la membrana (receptores, proteínas transportadoras, enzimas) y 3) la fusión de la membrana. En los eucariotes la fluidez es mantenida por la incorporación de cadenas de ácidos grasos poliinsaturados (AGPI) hacia el interior de los lípidos de membrana. Muchas de estas cadenas de AGPI se encuentran en la posición 2-C de la molécula de glicerol de los fosfolípidos. particularmente fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamina.

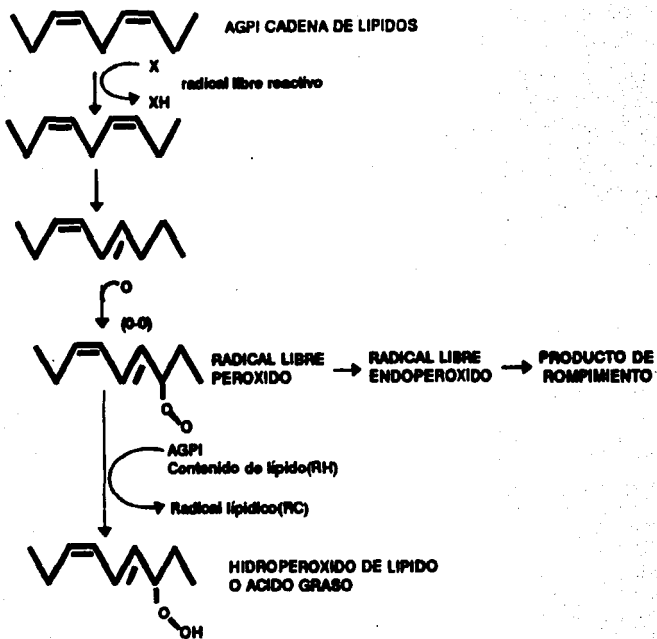


Figura 2 Reacción en cadena de la peroxidación de lípidos. (17)

Todos los AGPI comparten una estructura común la presencia de un doble enlace adyacente al enlace carbono-hidrógeno alílico. Los hidrógenos alílicos que se encuentran sobre un átomo de carbono entre dos dobles enlaces, son parcialmente activados por especies químicas que contienen uno o más electrones no apareados (radicales libres).

1.3.4.2. Reacciones de la peroxidación de lípidos. Figura 2.

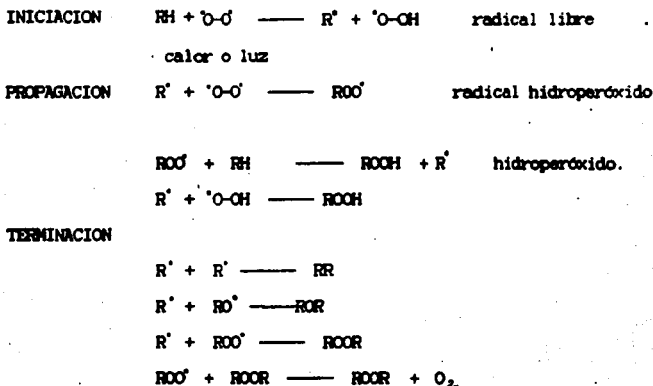
El mecanismo de la peroxidación de lípidos es del tipo de reacción en cadena, que consiste esencialmente en tres pasos: iniciación, propagación y terminación.

1). Iniciación: comprende la reacción de la cadena lateral de AGPI de un lípido con un radical libre reactivo para producir un radical libre de lípido, el cual al reaccionar con oxígeno molecular forma un radical peroxilípido.

2). Propagación: en esta etapa la reacción de un radical peroxilípido con otra cadena lateral de AGPI de una molécula de lípido produce un hidroperóxido lípido y un radical lípido, conservando así el número de radicales en la secuencia de reacción.

3). Terminación: es la remoción de los radicales libres, donde se combinan dos radicales para producir un producto no radical, finalizando así la reacción en cadena: $A + B \rightarrow AB$.

Figura 3.



R = grupo de ácidos grasos; RH = sitio de oxidación;
 R^{\cdot} = radical libre de ácido graso; ROO^{\cdot} = radical libre de péroxido;
 ROOH = hidropéroxido; RR = dímeros; ROOR = péroxidos.

Figura 3. Mecanismo de la peroxidación de lípidos.

El rompimiento de hidroperóxidos lipídicos es catalizado por metales de transición, particularmente por hierro y cobre.

Los productos de la peroxidación de lípidos incluye epóxidos, lípidos, hidroperóxidos, alcoholes, epóxidos y compuestos malondialdehído (MDA) de cadena corta, etano, pentano y 4-hidroxi alquenos. (5.18)

Los procesos de la peroxidación de lípidos pueden tener una variedad de efectos perjudiciales sobre la célula. Los radicales libres derivados de AGPI pueden sustraer átomos de hidrógeno de las proteínas de membrana y las enzimas que contienen enlaces sulfidrilo (SH) son particularmente susceptibles. Los radicales de aminoácido así generados pueden formar puentes disulfuro y enlaces covalentes entre proteína-proteína o entre lípido-proteína. Las membranas microsomales experimentan peroxidación in vitro mostrando fragmentación, destrucción del citocromo P-450 y pérdida de latencia. La enzima Ca^{2+} -ATPasa de la membrana plasmática es inactivada por la oxidación de grupos sulfidrilo esenciales para la enzima, y como resultado hay un deficiente control del calcio citosólico. Los ribosomas se desprenden del retículo endoplásmico durante la peroxidación de lípidos. (3.18) En la mitocondria, la peroxidación causa inflamación de la membrana, deterioro del transporte de electrones y lisis del organelo. La peroxidación de lípidos en

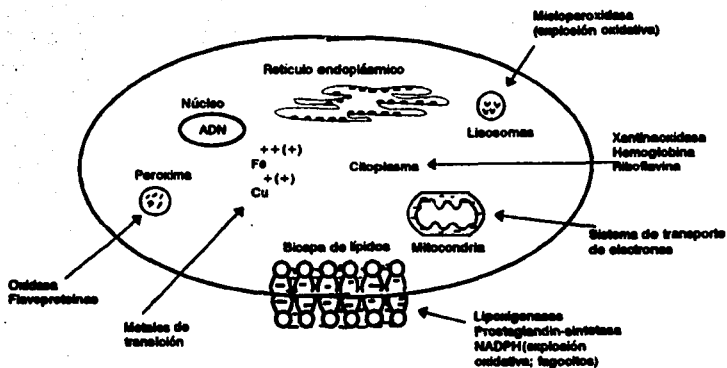


Figura 4. Fuentes celulares de radicales libres.

Los radicales libres son producidos en las células por la acción directa de varias enzimas solubles y ligadas a la membrana. La capacidad de rutas específicas para producir radicales libres varía con el tipo de célula, pero todas las células aerobias parecen ser capaces de producir algún nivel de radicales libres. (23)

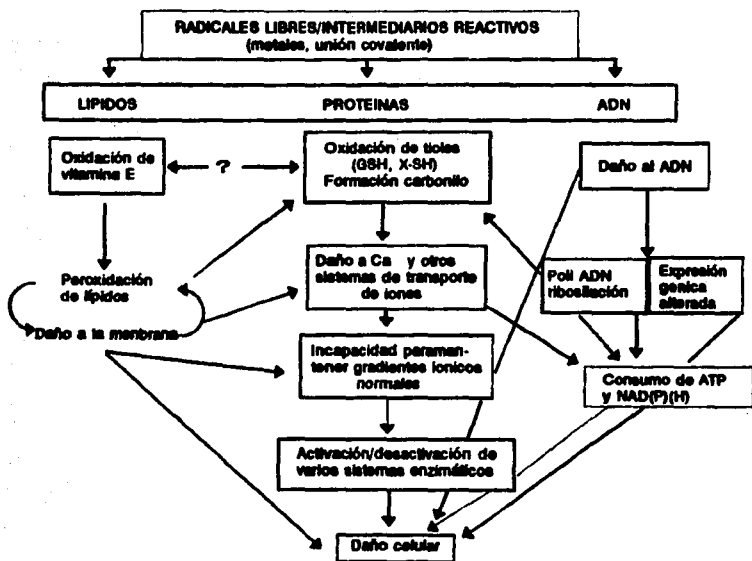


Figura 5 Mecanismo mediante el cual los radicales libres producen daño a las células. La capacidad de los radicales libres para interactuar con los lípidos, las proteínas y el ADN provee el potencial para numerosos cambios que pueden afectar la función celular. (23)

los lisosomas causa lisis y liberación de enzimas. En el núcleo la membrana nuclear puede ser peroxidada. (3)

Por todo lo anterior, es razonable suponer que el organismo tiene desarrollados mecanismos de defensa efectivos para protegerse contra la acción destructiva de los radicales. Muchas enzimas protegen a la célula del daño oxidativo, particularmente, la superóxido-dismutasa, glutatión-peroxidasa, NAD(P)H:quinona-reductasa y la glutatión-S-transferasa. Los niveles de actividad e índice de formación de estas enzimas influyen en la defensa celular contra los radicales. (16)

Bajo condiciones normales estas defensas parecen proveer una protección adecuada para la integridad de la célula, pero existe la posibilidad de que en algunas circunstancias, tales como la presencia de ciertos xenobióticos, la efectividad de estas defensas pueda disminuir o ser abatida completamente. (3)

Recientes investigaciones sugieren que la peroxidación de lípidos y la formación de radicales libres es una propiedad común de agentes promotores. La acción de los agentes promotores es inhibida por antioxidantes; por la enzima superóxido-dismutasa, así como por inhibidores de la síntesis de prostaglandinas, tales como la Indometacina, el Imidazol y el ácido 5,8,11,14-eicosatetraenoico.

Una de las proposiciones más atractivas para la prevención de enfermedades, involucra el uso de nutrientes específicos para proteger a los tejidos contra daño tóxico, carcinogénico y contra enfermedades degenerativas. Los agentes protectores más estudiados son los nutrientes antioxidantes, los cuales incluyen a las vitaminas E, C y A; carotenoides, y numerosos compuestos polifenólicos. (25,40) Ya que estos compuestos "limpian" directamente de reactivos oxidantes, se sugiere que ellos constituyen una defensa vital endógena contra la célula oxidativa y el daño tisular causado por químicos tóxicos y carcinogénicos. La gran evidencia de que ellos desempeñan este papel protector a llevado al uso farmacológico de nutrientes antioxidantes. (3,27)

1.4. ANTIOXIDANTES.

En general, los antioxidantes son compuestos polifenólicos más o menos liposolubles, que reducen el rango de autooxidación de los ácidos grasos expuestos al oxígeno atmosférico. (43,52,55)

1.4.1 MECANISMO DE ACCION.

Los antioxidantes actúan interrumpiendo la reacción en cadena productora de peróxidos, al inactivar a los radicales iniciales o a los formados en la reacción en cadena. (16,40,55)

La vitamina E y otros antioxidantes de lípidos actúan como rompedores de cadena, usualmente por donación de un átomo de hidrógeno al radical peróxido ($ROO\cdot$), formando el hidroperóxido ($ROOH$) y la forma semiquinona del antioxidante. El $ROOH$ es más estable que el $ROO\cdot$ y no es capaz de iniciar reacciones de oxidación en cadena. En resumen, los antioxidantes son "limpiadores" de radicales libres peróxido. (5,55)

Puesto que, los radicales, como el radical libre de ácido graso ($R\cdot$) y el radical peróxido ($ROO\cdot$) juegan un papel catalítico, la cantidad de "atrapador" de radicales libres requerida para interrumpir el camino de propagación, es pequeño comparado con la cantidad de sustrato. La fracción molar

efectiva de antioxidante para sustratos oxidables (AGPI) usados en la industria alimenticia están aproximadamente en el rango de 1: 1000 a 1: 10 000. (52.55)

1.4.2. ANTIOXIDANTES NATURALES.

1. TOCOFEROLES. Los tocoferoles son componentes normales de muchas membranas celulares de mamíferos, y el α -tocoferol (vitamina E) es la forma más común. La vitamina E es un antioxidante biológico. (15)

En el caso de la vitamina E, el grupo hidróxilo del anillo aromático actúa como un donador de hidrógeno, resultando en la formación de un radical cromanoxi o fenoxil. (4,16,27)

La vitamina E es el mayor atrapador de radicales en las membranas lipídicas, y ha sido usado clínicamente en una variedad de enfermedades relacionadas a la oxidación. (16,27)

La vitamina E disminuye tanto el daño cardíaco como la carcinogenicidad de las quinonas adriamicina y daunomicina, las cuales son mutagénicas y carcinogénicas. (16,19,27)

2. PIGMENTOS CAROTENOIDES. Los pigmentos carotenoides se encuentran generalmente presentes en las membranas de bacterias y plantas, y también se hallan en la piel de animales. Los carotenoides han mostrado ser "atrapadores" de radicales oxígeno y pueden proteger contra la fotosensibilización provocada por la luz y contra la peroxidación de lípidos si el O_2 está involucrado. (16.27.44)

El B-Caroteno es otro antioxidante de la dieta que puede proteger al cuerpo graso y a las membranas lipídicas contra la oxidación. Los carotenoides son atrapadores de radicales libres extraordinarios represores del oxígeno monoatómico. El B-caroteno está presente en zanahorias y en todo alimento que contiene clorofila, y parece ser la principal defensa contra el oxígeno monoatómico, generado como un subproducto de la interacción entre la luz y la clorofila. Los carotenoides han mostrado ser anticarcinógenos en ratas y ratones. Los carotenoides (presentes en vegetales amarillos y verdes) pueden ser anticarcinógenos en los seres humanos. (16.27.44)

3. GLUTATION. El glutatión está presente en alimentos y es uno de los mayores antioxidantes y antimutagénos en la fracción soluble de las células. Las enzimas glutatión-transferasas (algunas de las cuales tienen actividad peroxidasa) son la mayor defensa celular contra carcinógenos oxidativos y alquilantes. (16.27)

4. ACIDO ASCORBICO. El ácido ascórbico de la dieta, es también importante como antioxidante. Ha mostrado ser un anticarcinógeno en roedores tratados con radiación ultravioleta, benzo(a)pireno y nitrito. (16.27)

5. ACIDO URICO. El ácido úrico es un fuerte antioxidante presente en altas concentraciones en la sangre de los humanos. La concentración de ácido úrico en la sangre puede incrementarse por purinas en la dieta; sin embargo, en grandes concentraciones produce Gota. (16.27)

6. FENOLES DE PLANTAS. Los constituyentes fenólicos de las plantas han mostrado poseer varias actividades, las cuales pueden influir en el efecto tumoral de ciertos carcinógenos químicos. Algunos fenoles vegetales han mostrado inhibir la actividad de enzimas dependientes del citocromo P450 que metabolizan drogas y carcinógenos. (3.9.34.44)

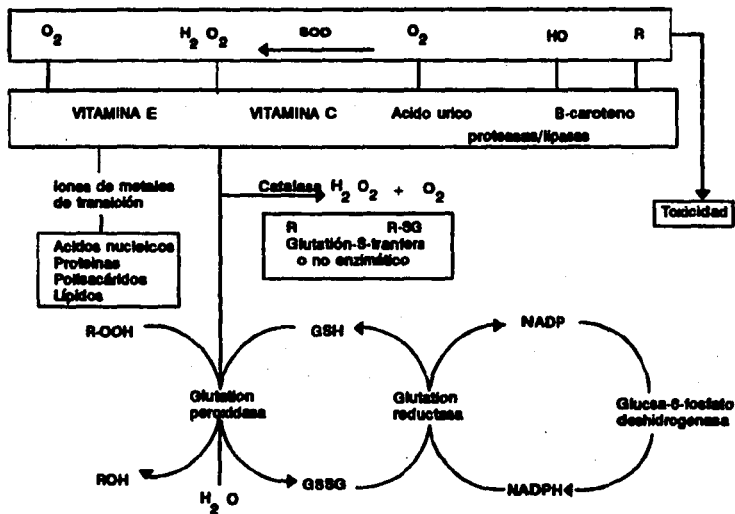


Figura 6. Antioxidantes biológicos: Sistemas de defensa.

Todas las células aeróbicas contienen un espectro de antioxidantes químicos y enzimáticos que trabajan en armonía para minimizar las indeseables reacciones oxidativas dentro de las células.

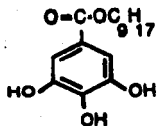
SOD: Superóxido dismutasa; GSH: Glutación-reductasa; GSSG: Glutación disulfido. (23)

1.4.3. ANTIOXIDANTES SINTETICOS.

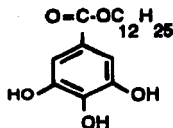
En la fig. 7 se muestran las estructuras químicas de los aditivos antioxidantes para alimentos más importantes, que son fenoles de varios tipos. (55)

i. GALATOS. Los ésteres del ácido gálico más utilizados son los de propilo, octilo y laurilo; su solubilidad aumenta en este orden, siendo el primero bastante soluble en agua. Los galatos colorean los alimentos de azul, en presencia de hierro. Los secuestradores impiden la reacción. (55)

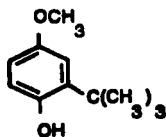
ii. FENOLES SUBSTITUIDOS. Es el grupo más importantes y sobre todo el Butilhidroxianisol (BHA) y el Butilhidroxitolueno (BHT). El BHA comercial está compuesto, principalmente por dos isómeros: el 3-terbutil-4-hidroxianisol y el 2-terbutil-4-hidroxianisol. El BHA y el BHT son fácilmente solubles en grasa y aceites y casi insolubles en agua. Muy parecida es la Diterbutilhidroquinona (TBHQ). Estos antioxidantes han sido ampliamente utilizados como aditivos alimenticios en diversos alimentos procesados. (5.16,20,55)



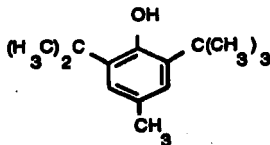
Galato de octilo



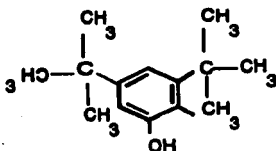
Galato de taurilo
Galato de dodecilo



BHA
Butilhidroxianisol



BHT
Butilhidroxitolueno



TBHQ
Diterbutilhidroquinona

Figura 7. Estructuras químicas de los principales antioxidantes sintéticos. (11,55)

El gran número de estados patológicos que han sido asociados con la relevante producción de radicales libres, y los efectos tóxicos que frecuentemente acompañan al uso de antioxidantes sintéticos, marca el interés para ensayar compuestos presentes en forma natural por su actividad antioxidante. Los lignanos y flavonoides están ampliamente distribuidos en el reino vegetal y se ha reconocido que algunos de ellos, debido a sus estructuras fenólicas, presenten actividad antioxidante hacia una variedad de sustancias fácilmente oxidables. (12,50)

1.5. COMPUESTOS FENOLICOS Y LIGNANOS.

1.5.1. COMPUESTOS FENOLICOS.

Los compuestos fenólicos o polifenoles son compuestos secundarios muy importantes producidos por plantas superiores. El número conocido de compuestos polifenólicos naturales excede los 4000, siendo inferior solamente a los alcaloides y terpenoides. Los fenoles de plantas incluyen, taninos, flavonoides hidroxilados, antraquinonas hidroxiladas y derivados del ácido cinámico. Se ha estimado que algunos individuos en la población humana ingieren aproximadamente un gramo de fenoles vegetales al día.

Los constituyentes fenólicos de plantas han mostrado poseer diversas actividades las cuales pueden influir sobre el efecto tumoral de varios carcinógenos químicos. Algunos fenoles de plantas han mostrado poseer actividad antioxidante, inhibir la formación de nitrosaminas, e inhibir la actividad de enzimas dependientes del citocromo P-450, que metabolizan drogas y carcinógenos. Por ejemplo, varios estudios indicaron que las aplicaciones tópicas del ácido tánico, quercetina, mirecitina y del ácido antraflavico a ratones SENCAR inhiben el metabolismo epidermal de hidrocarburos policíclicos aromáticos. (9,34)

1.5.2. LIGNANOS.

Los lignanos son productos naturales conocidos que están ampliamente distribuidos en el reino vegetal. En esta categoría general han sido identificados más de 200 compuestos con una gran variedad en la estructura química de las dos unidades fenilpropanoide características de los lignanos, así como en el grado de oxidación y los tipos de substituyentes que están presentes. (12,28)

La amplitud de las actividades biológicas de estos compuestos se ha considerado relativamente en forma reciente. El mayor interés está enfocado sobre los efectos de estos compuestos como agentes antineoplásicos, y la investigación en

está área ha revelado diversos mecanismos de acción por el cual ellos pueden regular el crecimiento de las células de mamífero. Es claro que los lignanos poseen una variedad de acciones farmacológicas en el hombre, aunque los más interesantes de estos son poco claros y no fácilmente estudiables. La reciente identificación de lignanos en la sangre y orina humana sugieren una necesidad de seguir y entender sus posibles papeles en la fisiología humana. (28)

Por otra parte, a nivel molecular se conoce que algunos lignanos se unen a los microtúbulos de la tubulina, interrumpen el transporte de nucleótidos y la síntesis de ADN y son inhibidores específicos para ciertas enzimas. (28)

Por definición, los lignanos son dímeros de unidades fenilpropanoide (C6-C3) ligados por el carbono central de sus cadenas laterales. (28)

1.5.2.1. ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE LOS LIGNANOS.

A) ACTIVIDAD ANTITUMORAL.

Los lignanos han despertado un considerable interés, ya que algunos de ellos manifiestan poseer actividad antitumoral. Estos

lignanos han sido identificados en numerosas plantas como resultado del proceso de tamizaje realizado para la actividad citostática. (28.34)

La tabla 1 incluye a todos los lignanos que han demostrado por métodos *in vitro* e *in vivo*, poseer actividades citostática o antitumoral. Con la excepción de tres: SP-1, VP-16-213 y VM-26, todos se encuentran en forma natural y han sido aislados de plantas superiores. (28)

B) ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA.

A los lignanos Nor-isoguayacin y al ácido Nordihidroguayarético (NDGA) se les ha reportado como inhibidores del crecimiento de especies bacterianas como: *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Bacillus subtilis* y, en el caso del Nor-isoguayacin de *Pseudomona aeruginosa*. La actividad antifungal contra *Rhizoctonia solani*, *R-oxisporum*, *Pythium spp* y *Rhizopus nigrans*, también se ha reportado para el NDGA. (28)

Compuesto.
-Acido Nordihidroguayarético
-Podofilotoxina
-c -Peltatina
-B-Peltatina
-B-Peltatin-A-metil eter
-Podofilotoxin glucosido
-Picropodofilotoxina
-Acido Picropodofilico
-Austrobailignano-1
-Difilina
-Justicidin-A
-Difilinina
-Dehidroanhidropicropodofilotoxina
-Stegnacina
-Stegnangina
-Stegnanol
-Stegnalona
- Acido Podofilico etilhidrazido (SP-1)
-4-Dimetil epipodofilotoxina etilideno-
-B-D-glucosido (VP-16-213)
-VM-26

tabla 2. Relación de compuestos lignanos
con actividad antitumoral. (26)

1.6. CARACTERISTICAS DEL ACIDO NORDIHIIDROGUAYARETICO.

El ácido Nordihidroguayaretico (NDGA) (fig. 8) es un lignano simple y un antioxidante fenólico presente de manera natural como exudado resinoso de muchas plantas, entre las principales tenemos a los *Guaiacum officinale*, *Guaiacum sanctum* y *Larrea divaricata*. Los primeros son pequeños árboles perennes que se encuentran en las regiones costeras áridas de América tropical. El *G. officinale* se encuentra sobre la costa de Venezuela y Colombia y en las Indias Occidentales, mientras que el *G. sanctum* se desarrolla en Cuba, Haití, Las Bahamas y Florida. *Larrea divaricata* es una planta desértica que se localiza en Norteamérica. El NDGA constituye aproximadamente el 10 % de la resina de estas plantas. (1.11.53.55)

Dadas sus características físico-químicas se utiliza como antioxidante de grasas animales, aceites vegetales y productos lácteos en industrias alimenticias de Estados Unidos. (42.53)

Estudios realizados por Zhi Y. Wang y colaboradores (1991) demostraron en *Salmonella typhimurium* (empleando la prueba de Ames) que el NDGA posee actividad antimutagénica contra el metil-metano-sulfonato, el benzo(a)pireno y la aflatoxina B1, con

y sin activación microsomal. En tanto que su acción antitumoral fue evidenciada en dos estadios de la formación del tumor : iniciación y promoción, en ratones hembra SENCAR. (9,46.52)

En recientes años se ha considerado al NDGA como un potente y selectivo inhibidor de la actividad lipoxigenasa. Los productos metabólicos de la enzima lipoxigenasa vía la cascada del ácido araquidónico han demostrado jugar un papel importante en la promoción del tumor de piel, inducido por el 13-acetato-12-O-tetradecanoilforbol (TPA). (1,31, 46, 53)

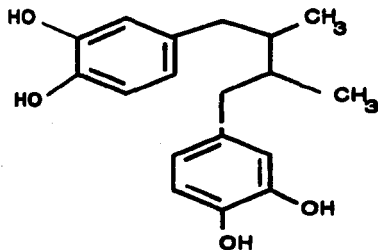


Figura 8. Estructura química del ácido Nordihidroguayarético (NDGA).

Al poseer grupos polares pero no iónicos, el ácido nordihidroguayarético puede interactuar con una variedad de sitios de alta afinidad de proteínas enzimáticas, por ejemplo, con el citocromo P-450, y por este hecho podría explicarse su actividad de inhibidor sobre la enzima lipoxigenasa. (53)

La inhibición de enzimas mono-oxigenasas dependientes del citocromo P-450, metabolizan a las sustancias precarcinogénicas o sus metabolitos reactivos electrofílicos en las células de mamífero pudiendo ser otra importante vía para las actividades antimutagénica y antitumoral del NDGA. (1)

1.7. SISTEMAS DE PRUEBA.

En la década pasada se ha visto el rápido desarrollo de sistemas de prueba diseñados no solamente para detectar sustancias químicas potencialmente mutagénicas en el ambiente, sino también para empezar a explorar los problemas relacionados con la estimación del riesgo potencial de mutágenos y carcinógenos ambientales para el ser humano. (10,29)

Como sistemas de prueba para la detección del daño genético se han utilizado tanto los sistemas *in vivo* como *in vitro*. (32)

Las pruebas *in vitro* son sencillas de realizar y nos proporcionan datos de gran interés. En estas pruebas se utiliza un agente genotóxico directamente sobre un cultivo celular, por lo tanto, se considera un sistema cerrado donde no participa el metabolismo ni la excreción de un organismo vivo. (13)

Los sistemas de cultivo de células de mamífero tienen diversos, importantes y significativos usos en la detección de mutágenos medioambientales y de antimutágenos, en ensayos de corta duración. En estos sistemas, la mutagenicidad de algunos carcinógenos, los cuales podrían ser negativos en ensayos de mutagenicidad microbiana, podrían ser detectados como mutaciones génicas, aberraciones cromosómicas, ruptura del filamento del

ADN, intercambio entre cromátides hermanas, etc. (13.25.29.50)

Ahora bien, el intercambio entre cromátides hermanas (ICHs) es considerada como la prueba citogenética más sensible, rápida y sencilla para evaluar el potencial genotóxico de una gran variedad de agentes mutagénicos y carcinogénicos. (8.32.38.39)

El intercambio entre cromátides hermanas es utilizado como una alternativa confiable y un "indicador biológico" reproducible en ensayos de toxicología genética que involucran exposiciones *in vivo e in vitro* a agentes genotóxicos. (8.32.38)

El estudio de los ICHs permite conocer la respuesta celular ante agentes que lesionan el ADN. Los diferentes sistemas experimentales usados en el análisis de este fenómeno pueden detectar la capacidad genotóxica de los agentes físicos y químicos a los que está expuesto el hombre. (32.39)

Los intercambios entre cromátides hermanas son un intercambio recíproco de secuencias de ADN en loci homólogos entre cromátides hermanas, durante la replicación del ADN cromosómico. (8)

El proceso de los ICH se lleva a cabo en la etapa de síntesis del ADN, y se ha propuesto que ocurre donde se bifurca la cadena doble del ADN durante el proceso de duplicación. Por



FALLA DE ORIGEN

Figura 9. Metafase de segunda división en la cual se aprecia el intercambio entre cromátides hermanas.

lo anterior es factible que las lesiones que no se reparan antes de la síntesis del ADN sean las causantes de los ICHs. (32)

El ICH es visualizado al microscopio al permitir a las células tratadas pasar a través de dos ciclos de replicación del ADN, en la presencia de 5-Bromodesoxiuridina (5-BrdU), la cual es incorporada en el ADN replicado. Las células son teñidas con un colorante fluorescente (HOESCHT 33258) e irradiadas con luz ultravioleta, la cual permite la diferenciación entre cromátides que contienen 5-BrdU de las que no lo contienen. (10,15)

El ensayo de ICHs se puede llevar a cabo sobre un sistema de cultivo de corta duración *in vitro*, usando linfocitos humanos de sangre periférica, los cuales son de fácil acceso para estudiar el daño biológico inducido por una gran variedad de agentes ambientales. La base para usar el sistema de linfocitos sanguíneos es que estas células usualmente permanecen en etapa G0/G1 en la circulación periférica y normalmente no se dividen *in vivo*. Los linfocitos son estimulados fácilmente a crecer en cultivo, y ellos tienen un bajo rango de aberraciones cromosómicas espontáneas. (8,29,32)

OBJETIVOS .

2. OBJETIVOS.

- 1) Evaluar el efecto citogenético que tiene el ACIDO NORDIHIROGUAYARETICO sobre un cultivo de linfocitos humanos, empleando la técnica de intercambio entre cromátides hermanas (ICH).

- 2) Determinar la frecuencia de los intercambios entre cromátides hermanas inducidas por diferentes concentraciones del ACIDO NORDIHIROGUAYARETICO sobre cultivos de linfocitos humanos de dos individuos.

- 3) Evaluar la cinética de proliferación celular e índice mitótico como parámetros para determinar el efecto citotóxico del ACIDO NORDIHIROGUAYARETICO.

M A T E R I A L Y M E T O D O S .

3. MATERIAL Y METODOS.

3.1. MATERIAL.

3.1.1. MATERIAL BIOLÓGICO.

- Sangre periférica de dos individuos femeninos sanos.

3.1.2 REACTIVOS.

- Acido Nordihidroguayarético (SIGMA).
- Fitohemaglutinina (PHA) estéril.
- Colchicina 0.2 mg/ml.
- Solución de KCL 0.075 M.
- Solución de citrato-fosfato pH 7.0.
- Solución salina de citrato pH 6.5.
- Colorante de HOESCHT 33258.
- Colorante de GIEMSA.
- 5-Bromodesoxiuridina (5-BrdU).

3.2 PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL.

En la figura 10 se observa en forma esquemática el procedimiento experimental realizado en este ensayo.

1. Se realiza la preparación de frascos de cultivo estéril, conteniendo cada uno las siguientes sustancias:

- 8.5 ml. de medio de cultivo Mc Coys 5A modificado.
- 0.51 ml. de Fitoheماغلوتينina estéril.
- 12 gotas de sangre periférica humana.

2. La mezcla contenida en cada frasco se homogeniza y se incuba a 37 °C por un periodo de 72 hrs. Este tiempo es considerado como hora cero.

3. A las 24 hrs. de incubación se agrega a cada cultivo el análogo de base 5-BrdU y las diferentes concentraciones del NDGA correspondientes a cada cultivo. (8)

4. Transcurridas 71 hrs. de iniciada la incubación de linfocitos se añade a cada frasco de cultivo el alcaloide colchicina (0.2 mg/ml), para detener el ciclo celular.

5. Al llegar a las 72 hrs. de incubación, se procede a obtener las células vaciando el contenido de los frascos a tubos de centrifuga, marcados previamente, los cuales se centrifugan por 10 min. a 1200 r.p.m., y el sobrenadante se desecha.

6. Una vez obtenido el paquete celular, se le realiza un

tratamiento hipotónico con KCL 0.075 M., y se incuban a 37°C por un tiempo de 30 min., transcurrido éste. se centrifugan para obtener el paquete celular. A estas células se les agrega una solución fijadora metanol-ácido acético en proporción de 3:1, dejándose reposar por un lapso de 15 min. Este procedimiento se repite tres veces. Con la suspensión celular final, se realizan las preparaciones cromosómicas (correspondientes a cada dosis) goteando esta suspensión sobre portaobjetos previamente desengrasados y limpios; se observan al microscopio para comprobar la existencia de metafases con el objetivo de 25X.

7. Se dejan reposar las laminillas por un día en un lugar limpio y fresco protegidas de la luz. Transcurrido este tiempo de reposo se procede a tefir diferencialmente las células, empleando la técnica de Goto modificada que ha continuación se describe:

a) Las laminillas se sumergen en el colorante de Hoescht 33258 durante 60 min.

b) Posteriormente se enjuagan con agua de la llave y se secan en el horno a 60 °C durante 5 min.

c) A continuación se montan en una solución reguladora de

citrato-fosfato pH 7.0 con un cubreobjetos para ser expuestas a la luz negra (luz ultravioleta cercana a los 10^{-7} cm.) por 60 min.

d) Enseguida se enjuagan con agua desionizada y se secan en el horno a 60 °C. durante 5 min.

e) Se incuban las laminillas en una solución salina-citrato (2 X SSC pH 6.5) a 60 °C por 20 min. Transcurrido este tiempo se enjuagan con agua de la llave y se secan en el horno a 60 °C durante 5 min.

f) Finalmente se tifen las laminillas con el colorante de Giemsa al 2 % en solución reguladora de fosfatos pH 6.8. por 10 min. Se enjuagan con agua de la llave y se dejan secar al aire.
(13)

8. Observación al microscopio.

A) Cuenta de Intercambio Entre Cromátides Hermanas (ICH).

Con el objetivo de 25 X se localizan las metafases que se encuentran en segunda división; y se procede a contar los inter-

cambios entre cromátides hermanas con el objetivo de inserción (100 X), esto se realiza en un total de 30 metafases para cada una de las concentraciones empleadas.

B) Índice Mitótico (I.M.).

El índice mitótico se obtiene al contar el número de células que se encuentran en etapa de metafase, contenidas en un total de 1000 células por cultivo y por dosis.

C) Cinética de Proliferación Celular (CPK).

El análisis de la CPK se realiza contando el número de metafases en primera división, segunda y tercera división celular, contenidas en 100 metafases por cultivo y por dosis.

9. Análisis estadístico.

El análisis estadístico se realizó de la siguiente manera:

- Para el ICH: - Analisis de varianza de 2 vias $\alpha=0.05$
- Prueba t student para comparar las medias.

- Para el I. M.: - Prueba de la media poblacional con varianza desconocida $\alpha= 0.05$.

- Para la CPK. -La prueba de Ji cuadrada $\alpha=0.05$.

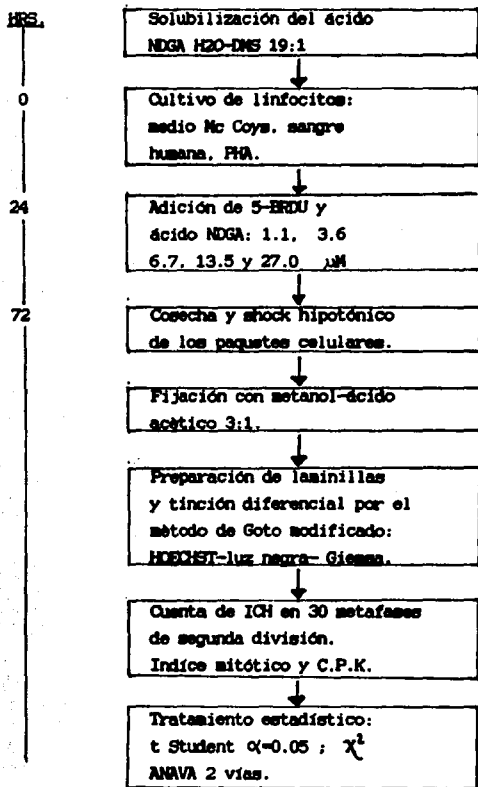


Figura 10. Procedimiento experimental esquematizado.

R E S U L T A D O S .

4. RESULTADOS.

Los resultados de los parámetros evaluados en los dos donadores se muestran en las figuras: 11, 12, 13, 14, y 15 .

La figura 14 muestra la frecuencia de ICHs inducidos por el NDGA en ambos donadores estudiados. En esta gráfica observamos que el ácido nordihidroguayaretico incrementó el número de ICH en función de la concentración empleada.

En el caso del donador 1 (don. 1) el número medio de intercambios por metafase celular para el testigo negativo (0.0 μM NDGA) fue de 8.43 con una desviación estándar de 2.02. Al emplear la prueba de t Student $\alpha = 0.05$ para comparar las medias encontramos que a partir de la primera dosis del NDGA (1.1 μM) ya existe una diferencia estadísticamente significativa con respecto al testigo negativo, con un valor de \bar{x} ICH = 9.86. FIGURA 11.

Por otra parte, el testigo negativo correspondiente al donador 2, tuvo un promedio de ICH por metafase de 8.26 con una desviación estándar de 2.43. Al realizar la comparación de medias con la prueba de t Student $\alpha = 0.05$, observamos que el promedio de intercambios (\bar{x} ICH = 9.53) a partir de la segunda concentración fue diferente estadísticamente respecto al testigo negativo.

Un análisis de varianza de dos vías fue usado para determinar la interrelación en los donadores examinados, encontrándose que no hay diferencia estadística entre ellos ($\alpha = 0.05$) en cuanto a la respuesta que ambos tuvieron sobre la formación de ICH.

La cinética de proliferación celular (C.P.K.) es un concepto que se refiere al comportamiento de las poblaciones celulares que están en división, la cual se realiza en intervalos de tiempo conocidos en condiciones normales, cuando estas condiciones se alteran por la acción de mutágenos, es posible que se presenten alteraciones de la cinética celular, principalmente retrasando la velocidad con que las células se dividen, lo cual se manifiesta como una acumulación de las células de primera división en relación a los valores normales.

Los resultados de este ensayo indican que existe un retraso del ciclo celular ejercido por el NDGA, pero este es estadísticamente significativo ($\alpha = 0.05$) solamente con la concentración más alta, tanto para el donador 1 como para el donador 2.

Otro parámetro evaluado fue el índice mitótico (I.M.) el cual es indicativo de la capacidad de división celular, en el que una célula origina a dos hijas, cada una con un complemento

cromosómico idéntico al de la célula progenitora. Cuando existen factores citotóxicos que alteran las fases del ciclo celular puede resultar una disminución del I.M. debido a la muerte de las células. En cuanto a este parámetro se observa un efecto inhibitor provocado por el ácido estudiado que es significativo con respecto al testigo negativo (0.0 μM NDGA) con la dosis más alta empleada en este ensayo, que es de 27.0 μM .

CUADRO DE RESULTADOS DEL ESTUDIO GENOTÓXICO DEL NDGA CORRESPONDIENTE AL DONADOR 1							
DOSIS µM	X ICH	DES. STD.	IND. MIT.	1a.	C P K 2a.	3a.	IND. REP.
0.0	8.43	2.02	2.4	39	52	9	1.70
1.1	9.86*	1.99	2.0	31	56	13	1.82
3.6	10.3*	2.70	2.0	37	49	14	1.77
6.7	11.46*	1.86	1.6	40	48	12	1.72
13.5	12.56*	2.09	1.5	39	45	18	1.77
27.0	14.93*	2.81	0.6	35	43	2<	1.06
*Diferencias estadísticamente significativas con respecto al testigo negativo. tstudent p= 0.05							
<Diferencias estadísticamente significativas con respecto al testigo negativo. ji cuadrada p= 0.05							

Figura 11. Resultados del estudio genotóxico del ácido nordihidroguayarático en cultivo de linfocitos humanos, correspondiente al donador uno.

CUADRO DE RESULTADOS DEL ESTUDIO GENOTÓXICO DEL NDGA CORRESPONDIENTE AL DONADOR 2							
DOSIS µM	X ICH	DES. STD.	IND. MIT.	C P K			IND. REP.
				1a.	2a.	3a.	
0.0	8.26	2.43	2.3	32	49	19	1.87
1.1	9.03	1.84	2.1	33	47	20	1.87
3.6	9.53*	2.62	1.6	24	49	27	2.03
6.7	11.1*	2.30	1.4	35	50	15	1.80
13.5	12.28*	2.49	1.2	40	47	13	1.73
27.0	12.63*	3.63	0.9	57	32	11<	1.54
*Diferencias estadísticamente significativas con respecto al testigo negativo. tstudent p= 0.05							
<Diferencias estadísticamente significativas con respecto al testigo negativo. ji cuadrada p= 0.05							

Figura 12. Resultados del estudio genotóxico del ácido nordihidroguayaretico en cultivo de linfocitos humanos. correspondientes al donador dos.

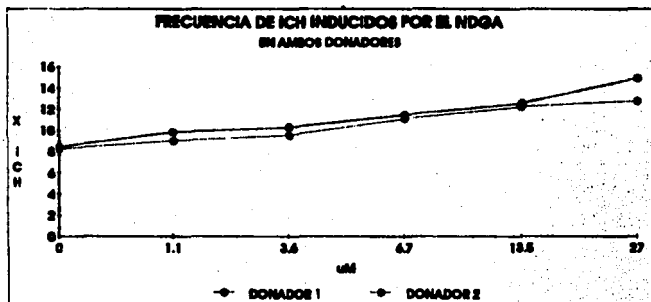


Figura 13. La gráfica muestra la relación entre las diferentes dosis del NDGA y el promedio de los ICHs en ambos donadores.

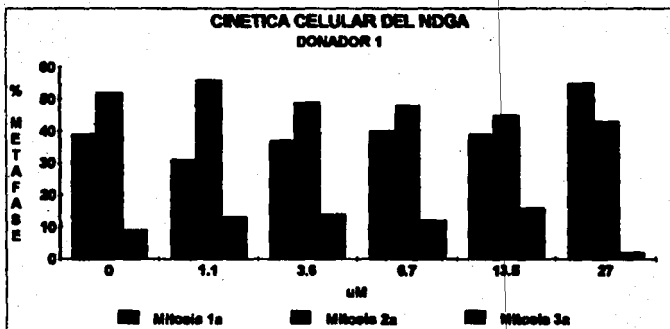


Figura 14. La gráfica muestra la cinética de proliferación celular del NDGA correspondiente al donador uno.

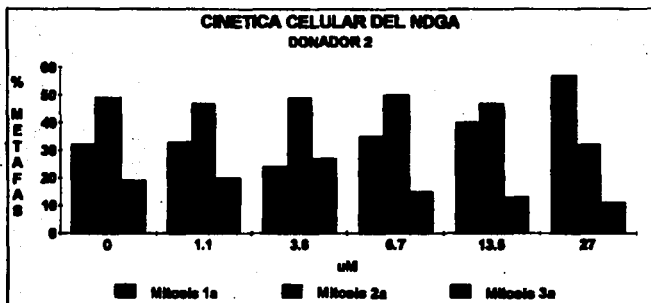


Figura 15. La gráfica muestra la cinética de proliferación celular del NDGA correspondiente al donador dos.

D I S C U S S I O N .

5. DISCUSION.

Son muchos los antioxidantes que han demostrado tener actividad anticarcinogénica, debido a ello, el ácido nordihidroguayarético se ha convertido en una molécula prometedora ya que los estudios encabezados por Mc Cormick y Spicer (29) mostraron que durante un período de dos años administrando ratas a razón de 1000 mg/Kg de peso, no se observaron efectos tóxicos y sí un amplio margen de seguridad para dicho ácido. Por otra parte, los estudios de quimioprevención utilizando de la segunda etapa de tumorigénesis en la piel de ratón por Nakadate y colaboradores han reportado que la administración tópica del NDGA puede inhibir la inducción de la actividad enzimática de la Ornitin Descarboxilasa-epidermal (ODC) y la promoción del tumor de piel por el 12-O-tetradecanoil-forbol-13-acetato.

También estudios realizados por Zhi Y. Wang y colaboradores (1991) indicaron que las aplicaciones tópicas del NDGA a ratas SENCAR inhiben el proceso carcinogénico epidermal de hidrocarburos policíclicos aromáticos; y que este mismo ácido presentó una acción antimutagénica en bacterias de *Salmonella typhimurium* contra la Aflatoxina B1, el benzo(a)pireno y metametilsulfonato.

No obstante, los buenos antecedentes mostrados por el NDGA, como anticarcinógeno, no existen estudios de evaluación genotóxica que permitan establecer criterios para su utilización en el humano; por lo tanto se diseñó el presente estudio donde el parámetro de evaluación fue citogenético utilizando para ello el cultivo de linfocitos humanos midiendo la frecuencia del intercambio entre cromátides hermanas.

Debido a que en esta primer etapa de evaluación, lo que se desea es determinar el potencial genotóxico del compuesto se trabajó con un amplio margen de concentraciones que van desde 1.1 μM hasta 27.0 μM ; estas concentraciones en relación a la comúnmente empleada del NDGA como antioxidante (0.02 % del contenido de grasa o aceite) representan una diferencia de 10 hasta 20 veces mayor, pero son las sugeridas por Brusick puesto que representan concentraciones que en el cultivo celular no provocan efectos tóxicos (como muerte celular) pero si es posible poner de manifiesto el daño sobre el material cromosómico.

En los estudios antecedentes del NDGA, los datos obtenidos muestran una acción protectora por parte del ácido con respecto a sustancias promotoras de tumor o de "no toxicidad" cuando se ha dado en la dieta, sin embargo al emplear el NDGA sobre el sistema de linfocitos humanos notamos que existe un incremento de ICHs importante.

Los resultados obtenidos con ambos donadores son muy semejantes, ya que la respuesta al incremento de ICH tuvo una diferencia significativa con $\alpha=0.05$ a partir de la primera dosis (1.1 μM) para el donador 1, y en la segunda concentración (3.6 μM) para el donador 2 con respecto al testigo negativo (0.0 μM); por lo anterior podemos decir que el NDGA es un activo inductor de ICHs.

La elección de dos donadores diferentes fue con el fin de descartar que el efecto observado fuera debido a la idiosincracia del individuo y no al efecto ejercido por el ácido.

Se ha utilizado como parámetro de análisis al ICH *in vitro* para evaluar el efecto de otros antioxidantes naturales como lo es la vitamina C; Stich reportó en 1976 que éstos eran inducidos en células de hámster chino expuestas durante 2 a 3 horas a una concentración de 1×10^{-4} a 1×10^{-3} M de ácido ascórbico, y que dicho efecto aumentaba para períodos de exposición aún más prolongados (hasta de 24 hrs) (Stich y cols. 1976 y 1979).

Al igual que Stich, Galloway y Painter realizaron la misma prueba, pero utilizando además linfocitos humanos y una dosis de ascorbato de 0.1-10 mM obteniendo también un incremento en los ICHs. En 1986 Krishna, Nath y Ong determinaron que el ácido ascórbico a una dosis máxima de 6.68 g/Kg en condiciones *in*

vivo/in vitro actuó como un agente co-inductor de ICH y fue tóxico para células de bazo.

Como observamos la vitamina C provocó un aumento del número de ICH por sí misma, pero no en la forma tan significativa como lo ha presentado el NDGA en nuestro ensayo. Por lo cual sería muy conveniente llevar a cabo otros estudios en los cuales se ponga en contacto al NDGA con una sustancia mutagénica conocida: todo lo anterior con el fin de saber si el efecto antígenotóxico por parte del ácido se hace evidente a pesar de que por sí solo dicho ácido está ejerciendo una acción genotóxica en este sistema de linfocitos humanos, ya que en los estudios dirigidos por Zhi Y. Wang y cols. éste ácido presenta una acción antitumoral al enfrentarlo con hidrocarburos policíclicos aromáticos (potentes carcinógenos) en ratas SENCAR y un efecto antimutagénico en *Salmonella typhimurium* sobre la aflatoxina B1, el benzo (a) pireno y el metilmetano sulfonato.

En nuestro sistema de prueba, la medida para evaluar el posible efecto citotóxico del NDGA fue a través de la medición de los parámetros de índice mitótico (I.M) y cinética de proliferación celular (C.P.K), los cuales representan la capacidad de división celular y de la velocidad de división celular respectivamente, la alteración de estos parámetros indica que existe muerte celular.

Los resultados del I.M y de la C.P.K. indicaron un incremento de los mismos en forma proporcional a la dosis empleada que no tuvo significancia estadística con respecto al testigo negativo. (0.0 μ M NDGA) sino hasta la última dosis utilizada (27.0 μ M).

Teniendo en cuenta estos resultados y los de la frecuencia de ICH, podemos decir que el NDGA no presento un efecto citotóxico evidente, pero sí un efecto genotóxico, lo que indica que la actividad sobre el DNA se manifiesta en primer lugar, aún antes del daño celular.

Por lo anterior podemos considerar que los efectos del NDGA sobre las células depende del sistema de prueba, de las dosis empleadas así como del metabolismo. En nuestro caso se trato de un sistema cerrado en donde no participó el metabolismo ni la excreción de un organismo, por lo cual consideramos que en estudios posteriores se pudiera simular el metabolismo al agregar una fracción microsomal de hígado de rata (fracción S9) y poder comparar si el efecto observado se sigue conservando o existan modificaciones.

Estudios posteriores encaminados a caracterizar más ampliamente a ésta sustancia podrían arrojar resultados más satisfactorios con el fin de, en un futuro, poder utilizar esta sustancia en la quimioprevención del cáncer.

C O N C L U S I O N E S .

6. CONCLUSIONES.

- 1). El Acido Nordihidroguayaretico es un activo inductor de la frecuencia de los intercambios entre cromátidas hermanas.
- 2). El comportamiento del NDGA en los cultivos de linfocitos provenientes de dos donadores fue similar.
- 3). El NDGA no presentó efecto citotóxico, pero si un efecto genotóxico, el cual es evidenciado al existir un fuerte incremento en el número de ICHs.
- 4). En base al índice mitótico y la cinética de proliferación celular no se encontró efecto citotóxico por parte del NDGA.

REFERENCIAS .

7. REFERENCIAS

- 1.- Agarwal,R.; Wang,Z.Y.; Bick,D.P. y Mukhtar,H. (1991) Nordihidroguayaretic acid. an inhibitor of lipoxigenase. Drug Metabolism and Disposition. 19 (3): 620-624.
- 2.- Alberts,B.; Bry,D.; Lewis,J.; Raff,M.; Roberts,K. y Watson, J.D. (1989) Molecular biology of the cell. Garland Publishing. USA. pp. 222-225.
- 3.- Ames,B.N. (1983) Dietary carcinogens and anticarcinogens. Science. 221: 1256-1262.
- 4.- Baserga,R. (1981) Tissue growth factors. Springer-Verlag Berling Heidelberg. USA pp.
- 5.- Cerutti,P.A. (1985) Prooxidant states and tumor promotion. Science. 227: 375-380.
- 6.- Chavéz,M.A. (1993) Estudio de las propiedades del extracto de *Mimosa tenuifolia* (tepescohuite) para su potencial uso cosmético. (Tesis) UNAM. PP. 14-17.
- 7.- Cohen,S.M. y Ellwein,C.B. (1991) Genetic errors, cell proliferation and carcinogenesis. Cancer Research. 51: 6493-6505.

- 8.- Das,B.C. (1986) Factors that influence formation of sister chromatid exchanges in human blood lymphocytes. Critical Reviews in Toxicology. 19: 43-81.
- 9.- Das,M.; Mukhtar,H.; Bick,D.P. y Bickers,D.R. (1987) Inhibition of epidermal xenobiotic metabolism in SENCAR mice by naturally occurring plant phenols. Cancer Research, 47: 760-766.
- 10.- De Flora,S. y Ramel,C. (1986) Mechanisms of inhibitors of mutagenesis and carcinogenesis. Mutation Research. 202:285-306.
- 11.- De Nava. C.C. y Galván,S.C. (1980) El riesgo genético de los compuestos. Ciencia y desarrollo, 5: 200-207.
- 12.- Fauré,M.; Lissi,E.; Torres,R. y Videla,L.A. (1990) Antioxidant activities of lignans and flavonoids. Phytochemistry. 29 (12): 3773-3775.
- 13.- Freshney,R.I. (1987) Culture of animal cells. Second edition. Wiley-Liss. USA. pp.
- 14.- Gorrod,J.W., OleischlUger,H. y Caldwell,J. (1988) Metabolism of xenobiotics. Taylor & Francis. Gran Bretaña. pp.

- 15.- Goto,K.; Akematsu,T.; Shimazu,H. y Sugiyama,T. (1975)
Simple differential Giemsa staining of sister chromatid after treatment with photosensitive dyes and exposure to light and the mechanism of staining. *Chromosoma*, 53: 223-230.
- 16.- Halliwell,B. y Gutteridge,J.M.C. (1988) Free radicals and antioxidant protection. *Human Toxicology*, 7:7-13.
- 17.- Hlavica,P. y Damani,C.A. (1991) N-oxidation of drugs. Chapman and Hall. Gran Bretaña. pp. 4,5.
- 18.- Horton,A.A. y Fairhurst,S. (1987) Lipid peroxidation and mechanism of toxicity. 18: 27-43.
- 19.- Hsie,A.W.; Xu,Z.; Yu,Y; Sognier,M.A. y Hrelia,P. (1990) Molecular analysis of reactive oxygen-species induced mammalian gene mutation. *Teratogenesis, Carcinogenesis y Mutagenesis*, 10:115-124.
- 20.- Ito,N.; Fukushima,S.; Tsuda,H. (1987) Carcinogenicity and modification of the carcinogenic response by BHA, BHT and other antioxidants. *Critical Reviews in Toxicology*, 15: 109-143.

- 21.- Johannsen, F.R. (1990) Risk assessment of carcinogenic and noncarcinogenic chemicals. Critical Reviews in Toxicology. 20: 341-342.
- 22.- Kada,T.; Kaneko,K.; Matsuzaki,S.; Matsuzaki,T. y Hara,Y. (1985) Detection and chemical identification of natural bio-antimutagens. Mutation Research. 150: 127-132.
- 23.- Kehrler,J.P. (1993) Free radicals as mediators of tissue injury and disease. Critical Reviews in Toxicology. 23(1): 21-48.
- 24.- Kohen,E. y Hirschberg,G. (1990) Cell structure and function by microspectrofluorometry. Academic Press. USA. pp.229-235.
- 25.- Kuroda,Y.; Jain,A.K.; Tezuka,H. y Kada,T. (1992) Antimutagenicity in cultured mammalian cells. Mutation Research. 267: 201-209.
- 26.- Levine,R. y Luft,R. (1974) Advances in metabolic disorders. Academic Press. USA. 7: 73-88.
- 27.- Liebler,D.C. (1993) The role of metabolism in the antioxidant function of vitamin E. Critical Reviews in Toxicology. 23 (2): 147-169.

- 28.- MacRae,W.D. y Towers,G.H.N. (1984) Biological activities of lignans. *Phytochemistry* 23 (6): 1207-1220.
- 29.- Maher,V.M. y Mc Cormick,J.J. (1982) Mutagenicity. New horizons in Genetic Toxicology. Academic Press. USA. pp. 215-230.
- 30.- Marnett,L.J. (1987) Peroxil free radicals. *Carcinogenesis*, 8: 1365-1373.
- 31.- Mc Cormick,D.L. y Spicer,. (1987) Nordihidroguayaretic acid suppression of rat mammary carcinogenesis induced by N-Methyl-N-Nitrosourea. *Cancer Letters*, 37: 139-146.
- 32.- Morales,R.P. (1988). El daño a la información genética y los intercambios entre cromátides hermanas. *Ciencia y desarrollo*. 14: 65-72.
- 33.- Morimoto,K.; Sato-Nizuno,M. y Koizumi,A. (1985) Sister-chromatid exchanges and cell-cycle kinetics in human lymphocyte cultures exposed to alkylating mutagens. *Mutation Research*, 152: 187-196.

- 34.- Mukhtar,H.; Das,M.; Khan,W.A; Wang,Z.Y.; Bik,D.P. y Bickers,D.R. (1988) Exceptional of tannic acid among naturally occurring plant phenols. *Cancer Research*, 48: 2361-2365.
- 35.- Nakadate,T. (1982) Epidermal ODC induction and arachidonate cascade. *Cancer Research*, 42: 2841-2845.
- 36.- Nakadate, T.; Yamamoto,S.; Ishii,M. y Kato,R. (1982) Inhibition of 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate induced epidermal ornithine decarboxylase activity by lipoxigenase inhibitors. *Carcinogenesis*, 3 (10): 1411-1414.
- 37.- Nakadate,T. (1989) The mechanism of skin tumor promotion caused by phorbol esters. *Japan J. Pharmacology*, 49: 1-9.
- 38.- Nakanishi,Y y Scheneider,E.L. (1979) In vivo sister-chromatid exchange. *Mutation Research*, 60: 329-337.
- 39.- Nichols,W.W. y Murphy, D.G. (1977) DNA Repair processes. *Symposia Specialist*. USA. pp. 147-148,185-187.
- 40.- Otha,T. (1993) Modification of genotoxicity by naturally occurring flavoring and their derivatives. *Critical Reviews in Toxicology*, 23 (2): 127-146.

41.- Pryor, W. (1984) Free radicals in Biology. Academic Press. USA. 4: 1-10, 129, 381-383, 407-411.

42.- Ramel, C.; Alekperov, U.K.; Ames, B.N.; Kada, T. y Wattenberg, L. (1986) Inhibitors of mutagenesis and their relevance to carcinogenesis. Mutation Research, 168: 47-65.

43.- Reinhold, V.N. (1977) The condensed chemical dictionary. Ninth edition. USA. p. 69

44.- Renner, H.W. (1990) In vivo effects of single or combined dietary antimutagens on mutagen induced chromosomal aberrations. Mutation Research, 244: 185-188.

45.- Santos, E. y Rodríguez, V.J. (1986) El cáncer. Prensa Científica. España. pp. 12, 26, 36, 62, 86.

46.- Schnader, J.; Undem, B.; Peters, S.P. y Sylvester, J.T. (1993) Effects of Nordihidroguayaretic acid on sulfidopeptide leucotriene activity and hipoxic pulmonary vasoconstriction in the isolated sheep lung. Prostaglandins, 46: 5-19

47.- Stansfield, W.D. (1992) Genética. 3a. edición. Mc Graw Hill. México. p. 523.

48.- Stryler. (1988) Bioquímica. Ed. Revertè. 3a. edición. Tomo I. España. pp.

49.- Therman, E. (1986) Human chromosomes. Springer-Verlag. Second edition, USA. pp.

50.- Trump, B.F.; Resau, J. y Barret, L.A. Methods in cell biology. Academic Press. USA, 1980. 21A pp. 1-13.

51.- Velázquez, G.N. (1993) Acción inhibitoria de la clorofilina sobre la genotoxicidad del benzo(a)pireno in vivo. (Tesis) IPN.

52.- Vergrossen, A.J y Crawford, M. (1989) The role the fats in human nutrition. Second edition. Academic Press, Gran Bretaña. 46: 374.

53.- Wang, Z.Y.; Agarwal, R.; Zhou, Z.C.; Bickers, D.R. y Mukhtar, H. (1991) Antimutagenic and antitumorigenic activities of Nordihydroguayaretic acid. Mutation Research. 261: 153-162.

54.- Wattenberg, L.W. (1985) Chemoprevention of cancer. Cancer Research. 45: 1-8.

55.- Yáfera, E.P. (1987) Química Agrícola III. Ed. Alhambra. España. pp. 197-201. 209-213.