



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
CUAUTITLAN

ESTUDIO DE LA CAPACIDAD ANTIGENOTOXICA DEL ACIDO  
NORDIHIIDROGUAYARETICO EVALUADA IN VIVO CON LAS PRUEBAS  
DE MICRONUCLEOS Y LA FRECUENCIA DE INTERCAMBIO  
DE CROMATIDAS HERMANAS.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:  
QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA

P R E S E N T A :  
MARIA DEL PILAR MARQUEZ BECERRA

ASESORA:  
M.en C. SANDRA DIAZ.BARRIGA ARCEO  
CO-ASESOR  
DR.EDUARDO MADRIGAL BUJAI DAR

CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEX.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

1997

40  
24.



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 esta 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  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN  
UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR  
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS



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

AT'N: Ing. Rafael Rodríguez Cubalios  
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 la TESIS:  
Estudio de la capacidad antigenotóxica del ácido nordihidroguaymarínico evaluada in vivo con las pruebas de microneleosis y la frecuencia de intercambio de cromátidas hermanas.

que presenta la pasante: María del Pilar Márquez Bonerra  
con número de cuenta: 8811662-4 para obtener el TÍTULO de:  
Química Farmacéutica Bióloga

Considerando que dicha tesis reúne los requisitos necesarios para ser discutida en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

A T E N T A M E N T E .  
"POR MI PAZA HABLARA EL ESPIRITU"  
Cuautitlan Izcalli, Edo. de Mex. a 29 de Agosto de 1997

PRESIDENTE	<u>Dra. Gilda Flores Rosales</u>	
VOCAL	<u>Q.F.B. Ilsa Esther Revuelta Miranda</u>	
SECRETARIO	<u>M.en C. Sandra Díaz Barriga Arceo</u>	
PRIMER SUPLENTE	<u>M.en C. Andres Romero Rojas</u>	
SEGUNDO SUPLENTE	<u>Q.F.B. Rosalba Bonilla Sánchez</u>	



**A mis amados padres:**

**Maria Luisa Becerra Guzmán.**

**Y**

**Roberto Márquez Márquez. †**

**El presente trabajo de investigación se realizó en el Laboratorio de Citogenética de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán de la UNAM con la colaboración del Laboratorio de Genética del Departamento de Morfología de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del IPN.**

# INDICE

Página

---

Resumen.....	i
--------------	---

## GENERALIDADES.

1.- MUTAGENOS.....	1
1.1.- AGENTES FISICOS.....	1
1.2.- AGENTES QUIMICOS.....	2
1.2.1.- Análogos de bases.....	3
1.2.2.- Mutágenos intercalantes.....	4
1.2.3.- Deaminación.....	5
1.2.4.- Agentes alquilantes.....	6
1.2.4.1.- Tipos de agentes alquilantes.....	6
1.2.4.2.- Mecanismo de unión al ADN.....	8
1.2.4.3.- Mecanismo de acción con el ADN.....	10
1.2.4.4.- Sistemas de reparación del daño producido en el ADN por agentes alquilantes.....	13
1.2.4.5.- Metil-metano-sulfonato.....	15
2.- MUTACION Y CANCER.....	18
3.- ANTIMUTAGENOS.....	20

<b>4.- RADICALES LIBRES</b> .....	<b>22</b>
<b>4.1.- NATURALEZA RADICAL DEL OXIGENO MOLECULAR</b> .....	<b>22</b>
<b>4.2.- RADICALES LIBRES DE OXIGENO</b> .....	<b>23</b>
<b>4.3.- ORIGEN CELULAR DE LOS RADICALES LIBRES</b> .....	<b>27</b>
4.3.1.- Fagocitosis.....	28
4.3.2.- Sistema mitocondrial de transporte de electrones.....	29
4.3.3.- Sistema microsomal de transporte de electrones.....	29
4.3.4.- Enzimas oxidasas solubles.....	29
4.3.5.- Autooxidación de sustratos endógenos o exógenos.....	30
4.3.6.- Metales de transición.....	30
<b>4.4.- REACTIVIDAD DE LOS RADICALES EN LOS SISTEMAS BIOLÓGICOS</b> .....	<b>30</b>
4.4.1.- Lípidos.....	31
4.4.2.- Proteínas.....	34
4.4.3.- ADN.....	34
<b>4.5.- DEFENSAS BIOLÓGICAS CONTRA RADICALES LIBRES DE OXIGENO</b> .....	<b>35</b>
<b>4.6.- ENFERMEDADES RELACIONADAS CON LA ACCIÓN DE LOS RADICALES LIBRES</b> .....	<b>37</b>
4.6.1.- Carcinogénesis.....	38
<b>5.- ANTIOXIDANTES</b> .....	<b>40</b>
<b>5.1.- ANTIOXIDANTES NATURALES</b> .....	<b>40</b>

5.1.1.- Vitamina E.....	40
5.1.2.- Carotenoides.....	41
5.1.3.- Vitamina C.....	41
5.1.4.- Flavonoides.....	42
5.2.- ANTIOXIDANTES SINTETICOS.....	42
5.3 ACIDO NORDIHIROGUAYARETICO.....	42
6.- SISTEMAS DE PRUEBA.....	46
6.1.- INTERCAMBIO DE CROMATIDAS HERMANAS.....	48
6.2.- PRUEBA DE MICRONUCLEOS.....	51
7.- OBJETIVOS.....	54
7.1.- OBJETIVO GENERAL.....	54
7.2.- OBJETIVOS PARTICULARES.....	54
8.- HIPOTESIS.....	55
9.- MATERIAL Y METODOS.....	56
9.1.- MATERIAL BIOLÓGICO.....	56
9.2.- REACTIVOS.....	56
9.3.- SOLUCIONES ADMINISTRADAS.....	57
9.4.- ENSAYO DE ICH.....	57



9.4.1.- Determinación de la dosis letal cincuenta del MMS.....	57
9.4.2.- Tratamiento.....	58
9.4.3.- Tinción diferencial.....	59
9.4.4.- Observación al microscopio.....	60
9.4.5.- Análisis estadístico.....	60
9.5.- ENSAYO DE MICRONÚCLEOS.....	62
9.5.1.- Determinación del tiempo de máxima Inducción de MN por el MMS.....	62
9.5.2.- Observación al microscopio.....	62
9.5.3.- Tratamiento anticlastogénico.....	63
9.5.4.- Observación al microscopio.....	64
9.5.5.- Análisis estadístico.....	64
10.- RESULTADOS.....	66
10.1.- ENSAYO DE ICH.....	66
10.2.- ENSAYO DE MN.....	71
11.- DISCUSION.....	75
12.- CONCLUSIONES.....	79
13.- BIBLIOGRAFIA.....	80

## RESUMEN.

---

El ácido nordihidroguayarático (ANDG) es un antioxidante polifenólico que de manera natural se extrae del exudado resinoso de arbustos de *Larrea divaricata* y *Larrea tridentata*; obteniéndose también por síntesis química. Tiene capacidad antitumoral en roedores y efecto antimutagénico en la prueba de AMES contra mutágenos como metil-metano-sulfonato (MMS), benzo(a)pireno y aflatoxina B<sub>1</sub>. Dadas estas características surge el interés de llevar a cabo un estudio del efecto antigenotóxico del ANDG en un organismo completo, se utilizó un sistema *in vivo* con ratones macho cepa NIH, la evaluación se realizó a través del estudio de la frecuencia de intercambio de cromátidas hermanas (ICHs) y la prueba de micronúcleos.

Para poder establecer la dosis de trabajo del mutágeno se determinó primeramente la dosis letal cincuenta (DL<sub>50</sub>) del MMS que fue de 177.48 mg/Kg.

En el ensayo de ICHs se formaron 8 lotes de 5 ratones cada uno, a los que al inicio del experimento se les implantó subcutáneamente una tableta de 45 mg de 5 Bromodesoxiuridina, a los 30 minutos se administraron 6 lotes con el ANDG con las siguientes dosis 1,6 y 11 mg/Kg, y una hora más tarde 4 lotes fueron inoculados con MMS a una dosis de 40 mg/Kg el lote restante fungió como control y recibió 0.3 ml de dimetilsulfóxido (DMSO) al 24% v/v. A las 21 horas se administró colchicina (5 µg/g) y transcurridas 24 horas los animales fueron sacrificados y se extrajo la médula ósea. Con las suspensiones celulares obtenidas de la cosecha se prepararon las laminillas que fueron tefidas con el método de Hoechst-Giensa.

El análisis citogenético se realizó evaluando la frecuencia de ICHs, cinética de proliferación celular e índice mitótico.

Para el ensayo de la prueba de micronúcleos se determinó primeramente el tiempo de máxima inducción de micronúcleos (MN) en eritrocitos policromáticos (EPC) por el MMS a una dosis de 40 mg/Kg para lo cual se utilizó un lote de 5 ratones a los que se les tomó muestra de sangre periférica por corte de la porción terminal de la cola antes de la inoculación y después de ésta a las 24,48,72 y 96 horas. Ya listas las laminillas se fijaron y tiñieron con Giemsa. Se analizaron los MN en 1000 EPC. La máxima inducción de MN en EPC por el MMS fue de 13.2 la cual correspondió a las 48 horas de haber sido administrado.

En la evaluación del efecto anticlastogénico del ANDG se formaron 7 lotes de 5 ratones cada uno, a los que se les tomó muestra sanguínea de la manera ya mencionada anteriormente, antes de la administración de cada tratamiento; enseguida se inocularon 6 lotes con las siguientes dosis del ANDG 6, 11 y 17 mg/Kg; a los 30 minutos se administró el MMS a la misma dosis que en el ensayo de la inducción de MN en EPC a los 3 lotes, el lote control recibió 0.3 ml de DMSO al 24% v/v. A cada uno de los tratamiento se les tomó muestra a las 48 horas. Las laminillas fueron teñidas con Giemsa y se analizaron los MN en 1000 EPC; además se cuantificaron 1000 eritrocitos con el fin de obtener la relación entre eritrocitos policromáticos y eritrocitos normocromicos.

Los resultados de ambas pruebas mostraron que el ANDG es un buen agente antigenotóxico y su comportamiento es dosis-respuesta, las mejores dosis de acción son las de 11 y 17 mg/Kg.

En cuanto a la evaluación de la citotoxicidad en el ensayo de ICHs a las dosis empleadas el ANDG no presenta efecto citotóxico, ya que no modifica el índice mitótico ni la cinética de proliferación celular; en la prueba de MN, el ANDG *per se* a las dosis empleadas modifica la producción eritropoyética, es decir reduce de manera estadísticamente significativa la relación EPC/ENC; pero al retarlo con el MMS el ácido logra restituir la actividad eritropoyética.

*GENERALIDADES*

## 1.- MUTAGENOS

Una mutación es un cambio súbito heredable que afecta al material genético de un organismo o célula; los agentes que causan las mutaciones son conocidos como mutágenos. Los agentes mutagénicos pueden ser físicos como la luz ultravioleta y las radiaciones y sustancias químicas que por sí mismas o después de una activación metabólica son capaces de alterar la información genética (Lewin B.1994, Salamanca F. 1990, Stanley E.1988).

### 1.1.- AGENTES FISICOS

Los rayos ultravioleta, gama y X, así como las emisiones alfa y beta son capaces de causar mutaciones. La acción de la irradiación ultravioleta puede ser explicado como un efecto específico a nivel molecular, pero las radiaciones de alta energía tienden a producir más eventos al azar como lo son los rompimientos de cadenas y cromosomas (Etine-Decant 1988, Smith W. 1990, Watson R. 1987).

La radiación es probablemente el mutágeno ambiental más común. La radiación ultravioleta (UV) en la luz solar, los rayos cósmicos (rayos gamma) y recientemente el radón (que emite largas partículas alfa) en alguna atmósfera familiar pueden causar mutaciones. Las emisiones alfa y beta no pueden penetrar profundamente en el tejido, pero si estos llegan a tener contacto muy cercano con éste, como el radón en los pulmones o es incorporado dentro de los tejidos, por ejemplo la inclusión de isotopos de fósforo o estroncio dentro de los huesos y dientes, puede causar efectos locales muy severos (Garner E. 1991, Goldstein A. 1989, Smith W. 1990).

En el laboratorio los rayos UV son las más convenientes para usarse como mutágeno, su efecto mutagénico máximo (y letal) es alrededor de una longitud de onda de 260 nm y ésta corresponde a la longitud de onda de máxima absorción del ácido desoxirribonucleico (ADN) (Garner, E.1991, Smith W.1990).

La energía de los rayos UV es principalmente absorbida por las pirimidinas del ADN; por lo cual donde existan dos pirimidinas adyacentes (en particular dos timinas) en una cadena de ADN y bajo la influencia de los rayos UV, se pueden enlazar mutuamente de manera covalente provocando la formación de los dímeros de timina como se muestra en la figura 1 y que conducen a una distorsión local en el ADN (Etlinne-Decant 1988, Garner E. 1991).

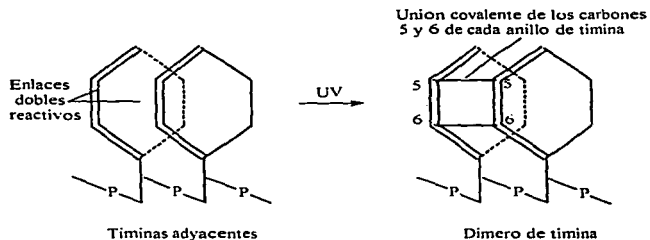


Figura 1: Dímero de timina formado por los rayos ultravioleta .

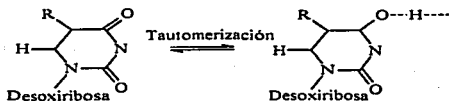
## 1.2.- AGENTES QUIMICOS

Los compuestos químicos pueden ser agrupados según sus propiedades y sus mecanismos de inducción del fenómeno mutacional.

### 1.2.1.- Análogos de bases.

Las bases análogas, tales como el 5-bromouracilo, la 5-bromo-2-deoxiuridina y las 2-aminopurinas, son estructuralmente similares a las bases encontradas naturalmente en el ADN, pero contienen modificaciones que incrementan la probabilidad de un mal apareamiento y de una tautomerización. El mecanismo de mutación implica la incorporación de la base análoga durante la replicación del ADN y un apareamiento equivocado con otra base nitrogenada de la cadena complementaria (Garner E. 1991, Lewin B. 1994, Miller J. 1992).

La base análoga más comúnmente utilizada es el 5-bromouracilo (5-Bru). En la forma ceto el 5-Bru es incorporado en lugar de la timina durante la replicación del ADN y se aparea con la adenina, lo que incrementa la tendencia de la tautomerización de la forma enol que se muestra en la figura 2, en consecuencia en el siguiente ciclo de replicación del ADN la base es probablemente complementada al parecer con una guanina resultando una transición adenina-guanina. Este podría ser un templete de transición, la forma ceto se incorpora correctamente en el sitio opuesto a la adenina y tautomeriza la forma enol en el templete del ADN para el siguiente ciclo de replicación. Alternativamente, pero con más frecuencia el tautómero enol puede ser incorporado en el sitio opuesto al de la guanina, tautomerizando la forma ceto, específicamente la adenina y se complementa a una transición guanina-adenina. Esto es referido a una transición de sustrato porque el error de apareamiento con la guanina ocurre durante la incorporación y no por el cambio que ocurre después de la incorporación del templete (Salamanca F. 1990, Smith W. 1990, Williams K. 1991).



Timina (R=CH<sub>3</sub>)  
 5-Bromouracilo (R=Bromo)

**Figura 2.- Tautomerismo de timina y 5-bromouracilo.**

**1.2.2.- Mutágenos intercalantes.**

Los mutágenos intercalantes son moléculas planas que contienen series de anillos (policíclicos) que se enlazan a sus equivalentes bases planas púricas y pirimidicas de ADN; los colorantes derivados de acridina con núcleos de dimensiones exactas para intercalarse en la doble hélice ocasionan un alargamiento de ésta como se muestra en la figura 3. por lo que si se transcribe el ADN se produce una mutación por corrimiento, desfaseamiento o transversión (Salamanca F. 1990, Smith W.1990, Williams K. 1991).



**Figura 3. Estructura anormal resultado de una mutación provocando la distorsión de la doble hélice causada por la intercalación de la acridina entre las bases.**



### 1.2.3.- Deaminación.

Tres de las cuatro bases naturales en el ADN tienen grupos amino (adenina, guanina, citosina) y estos pueden ser removidos por reacciones con agentes como lo es el ácido nitroso ( $\text{HNO}_2$ ). La acción del  $\text{HNO}_2$  es la conversión de los grupos amino a grupos ceto, lo que provoca cambios en las propiedades de apareamiento (Lewin B. 1994, Stanley E. 1988, Smith W 1990).

Los productos de reacción y sus propiedades de apareamiento son:

adenina  $\xrightarrow{\text{HNO}_2}$  hipoxantina, que se aparea con citosina

guanina  $\xrightarrow{\text{HNO}_2}$  xantina, que se aparea con citosina

citosina  $\xrightarrow{\text{HNO}_2}$  uracilo, que se aparea con adenina

5-metilcitosina  $\xrightarrow{\text{HNO}_2}$  timina, que se aparea con adenina

La hidroxilamina ( $\text{NH}_2\text{OH}$ ) deamina a la citosina formando derivados N-hidroxilados en las posiciones 4 ó 6 e incluso en ambas siendo su producto de reacción y su apareamiento el siguiente:

citosina  $\xrightarrow{\text{NH}_2\text{OH}}$  4-N-hidroxicitosina, que se aparea con adenina. (Salamanca F. 1990, Smith W. 1990).

#### 1.2.4.- Agentes alquilantes

La palabra alquilante deriva del término alcano, y se emplea para denominar a cualquier cadena hidrocarbonada con la fórmula general  $C_nH_{2n+2}$ . Algunos autores definen a estos compuestos químicos como sustancias capaces de reemplazar un átomo de hidrógeno, en otra molécula, por un radical alquilo. Otros los describen como un grupo de compuestos químicos con capacidad para establecer enlaces covalentes con los ácidos nucleicos (González B. 1989).

Los agentes alquilantes son carcinógenos y mutágenos muy potentes en una gran variedad de organismos; la facilidad con que algunos de éstos químicos reaccionan directamente con macromoléculas hace que sea particularmente conveniente estudiar los mecanismos de interacción con el ADN (Beranek T. 1990, Salamanca F. 1990).

El daño resulta por la alquilación, la transferencia de un grupo metil ( $CH_3$ ) o etil ( $C_2H_5$ ), en los sitios reactivos en las bases y los fosfatos en la cadena de ADN (Stanley E., Watson H. 1987).

Se distinguen dos tipos de agentes alquilantes en función del número de radicales alquilos los monofuncionales, con un sólo grupo alquilo activo, y los polifuncionales, con dos o más grupos alquilo (Beranek E. 1993, Goldstein A. 1979, Smith W. 1990).

##### 1.2.4.1.- Tipos de agentes alquilantes.

Los agentes alquilantes simples, principalmente metilantes y etilantes, no son generalmente considerados como contaminantes ambientales, pero son el modelo de compuestos que por formar reactivos de muchos alquil carcinógenos. Los agentes alquilantes son divididos dentro de tres grupos:

- a) Alquil sulfatos, consistentes de dietil (DES) y dimetilsulfato (DMS)
- b) Alquil alcanosulfonato, incluyen al metil (MMS) y etilmetanosulfonato (EMS)

c) Nitrosaminas, en las que encontramos a la metil (MNU) y etilnitrosourea (ENU), metil- (MNNG) y etil N'-nitro-N-nitrosoguanidina (ENNG), y dimetilnitrosamina (DMN) que ambas actúan indirectamente y la dietilnitrosamina (DEN).

Los alquil sulfonatos fueron inicialmente desarrollados para causar esterilidad a insectos y roedores y fueron considerados para usarse como anticonceptivo masculino. Mas recientemente los alquil sulfonatos son usados como agentes alquilantes solubles en agua en síntesis químicas. La MNU, ENU y la MNNG se les encontró utilidad en laboratorios químicos para generar diazo compuestos.

La MNU y la ENU junto con los di-alkil sulfatos son usados biológicamente como agentes mutagénicos para crear nuevas variantes de plantas. Sin embargo no se produce en escala comercial, la MNNG y MNU son producidas concurrentemente para la investigación. La DES y la DMS son producidas en Estados Unidos y son usadas en la industria para preparar derivados de alquil para aminas, alcoholes y ácidos orgánicos. Las dialquilnitrosaminas difieren de los alquil sulfonatos, alquil nitrosoureas y alquil alcanosulfonatos en que estas no actúan directamente, es decir que sufren una activación metabólica antes de exhibir sus efectos. En tanto agentes alquilantes como la DEN y DMN son encontrados en cantidades variantes en muchos productos alimenticios (Beranek T. 1990).

Los alquilantes al interactuar con el material genético, frenan la replicación y por ende la división celular, además de que las mutaciones ocasionadas a las células pueden ser letales, siendo ésta la base para utilizarlos como agentes terapéuticos en procesos neoplásicos; actualmente cinco tipos de agentes alquilantes se usan en la quimioterapia: 1) las mostazas nitrogenadas, 2) la etiléniminas, 3) los alquilsulfonatos, 4) las nitrosoureas y 5) los triacenos (Goodman, S. 1994).

#### 1.2.4.2.- Mecanismo de unión al ADN

La simple unión de los agentes alquilantes a la variedad de sitios en la molécula de ADN sigue básicamente el papel de electrofilidad y nucleofilidad Swenson (1983) revisó las teorías químicas que involucran la sustitución del metil o etil, y se ha explicado esas sustituciones usando dos relaciones fundamentales; el concepto de Ingold de la sustitución nucleofílica (SN) y la ecuación de Swain-Scott por el porcentaje de reacción relativa. Bajo el concepto de SN de Ingold se involucran los tipos de reacción de sustitución nucleofílica tipo 1 (SN<sub>1</sub>) y sustitución nucleofílica tipo 2 (SN<sub>2</sub>); la reacción de SN<sub>2</sub> es bimolecular y es estrictamente dependiente de la estereoquímica. Este tipo de sustitución involucra un estado de transición donde el ataque electrofílico al centro nucleofílico forma un complejo de transición cuando al formarse el producto alquilado se libera al grupo saliente. En general, las reacciones de SN<sub>1</sub> siguen una cinética de primer orden. El porcentaje de la reacción completa es dependiente de la formación del carbocatión electrofílico intermediario. Este intermediario es rápidamente atrapado por el centro nucleofílico en la formación de la macromolécula formando un enlace covalente. Bajo este concepto de reactividad el electrófilo es dependiente de la estabilidad del carbocatión y de la capacidad del grupo saliente (Beranek T. 190, Brookes P. 1990. Vogel W. 1994).

La ecuación de reactividad de Swain-Scott es expresada como:

$$\log (K_y / K_x) = S(n_y - n_x) \text{ donde:}$$

S= es una expresión de la electrofilidad de el agente

n<sub>y</sub>, n<sub>x</sub> = expresan la nucleofilidad de los sitios "y" y sitios "x"

K<sub>y</sub>, K<sub>x</sub> = son el porcentaje constante de los sitios "y" y los sitios "x" respectivamente

El valor de S es determinado en base a la reactividad relativa experimental de bromometil en donde se le asigna a S un valor de 1.0. Los valores de nucleofilidad tienen como base el valor de

reactividad relativa del agua en donde se le asigna a  $n$  un valor de 0. Factores  $S$  bajos son generalmente asociados con una gran reactividad de  $SN_1$ , cuando el factor se aproxima a 1 indica un carácter de  $SN_2$ .

Los valores de  $S$  y el mecanismo de reacción de Ingold para una serie de agentes alquilantes se muestra en la siguiente tabla (Beranek T. 1990, Brookes P. 1990):

Tabla 1: Reactividad relativa de agentes alquilantes y su relativa afinidad por el átomo de oxígeno de ADN.

Carcinógeno	S	Mecanismo	% O <sup>+</sup> : N <sup>+</sup>
bromometil	1.0	SN <sub>2</sub>	----
DMS	1.0	SN <sub>2</sub>	0.0005
MMS	>0.83	SN <sub>2</sub>	0.003-0.004
EMS	0.67	SN <sub>1</sub> /SN <sub>2</sub>	0.03
DÉS	0.64	---	0.02-0.03
DMN	---	---	0.1
MNU	0.42	SN <sub>1</sub>	0.1
MNNG	0.42	SN <sub>1</sub>	0.1
DEN	0.42	---	0.5
ENU	0.26	SN <sub>1</sub>	0.6

Una alternativa que se aproxima al concepto de Swain-Scott e Ingold fue ofrecida por Saffhill y colaboradores (1985). Ellos sugieren que el concepto tiene sólo la habilidad limitada de predecir los productos de reacción de la alquilación de ADN y sugiere la teoría de Pearson (1966) basada en la fuerza y debilidad de los ácidos (Beranek T. 1990).

De acuerdo con la teoría de ácidos fuertes (por ejemplo especies electrofílicas) tienen preferencias por bases fuertes (por ejemplo especies nucleofílicas), mientras que los ácidos débiles prefieren bases débiles (Beranek T. 1990, Brookes P. 1990).

En términos de ácidos fuertes y ácidos débiles, los agentes alquilantes no son ácidos ni fuertes ni débiles pero son intermedios en términos de esa actividad. Similarmente en el ADN los átomos de nitrógeno (N) en el anillo y los átomos de oxígeno (O) del hexocíclico de las bases púricas y pirimídicas son también intermedias en esa basicidad. Los átomos de N y O en el ADN podrían ser los sitios preferentes para la alquilación. Dentro de la clasificación intermedia, los átomos de O son las bases

más fuertes que los átomos de N, y entonces las especies electrofílicas formadas por los compuestos N-nitrosos mostrarían preferencia principalmente por reaccionar con el átomo de O que los alcanosulfonatos.

Las alquil nitrosoureas preferentemente se unen al oxígeno por mecanismos de SN1 o por una interacción fuerte ácido-base, donde el metil-metano-sulfonato muestra una preferencia por el sitio de la guanina, y reacciona a través de un mecanismo de SN2.

La distribución de los productos de alquilación parecen ser un importante factor en los efectos biológicos generados por agentes alquilantes, entonces la mutagenicidad o carcinogenicidad relativa de los agentes alquilantes simples parece correlacionarse con la habilidad de unirse a los sitios de oxígeno (Beranek T. 1990).

#### 1.2.4.3.- Mecanismo de acción con el ADN.

En general, la guanina es la base más vulnerable a la alquilación siendo los sitios más frecuentemente atacados el O<sup>6</sup> y el N<sup>7</sup> (Garner E. 1994, Goldstein A. 1979, Stanley E. 1988).

La metilación del oxígeno del átomo de carbono número 6, da como producto a la O<sup>6</sup>-metilguanina la cual se muestra en la figura 4 que se aparee con timina, cambiando de guanina-citosina (GC) a adenina-timina (AT) cuando el ADN se replica.

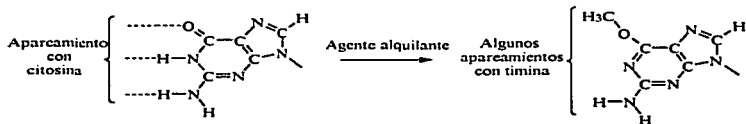


Figura 4. Reacción de la guanina con un agente alquilante produciendo a la O<sup>6</sup>-metil guanina. (Garner E. 1991, Watson H. 1987, Williams K. 1991).

La alquilación del nitrógeno 7 de los residuos de guanina del ADN, una reacción altamente favorecida puede ejercer varios efectos de considerable importancia biológica (Goodman Y. 1980, Williams K. 1987).

Normalmente, los residuos de guanina del ADN existen principalmente como ceto tautómeros y forman fácilmente pares básicos de Watson-Crick por unión de hidrógeno con residuos de citosina. No obstante, cuando el nitrógeno 7 de la guanina se alquila (convirtiéndose en un nitrógeno amonio cuaternario), el residuo de guanina es más ácido y el tautómero enol es favorecido como se puede observar en la siguiente figura:

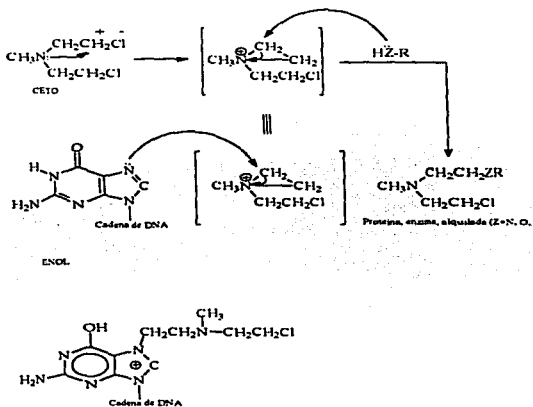


Figura 5: Formación del tautómero enol por la alquilación de la guanina.

La guanina en esta forma puede formar pares básicos con residuos de timina, llevando así a una posible codificación errónea y a la eventual sustitución de un par básico guanina-citosina por otro básico adenina-timina como se muestra en la figura 6 (Goodman, Y. 1980).

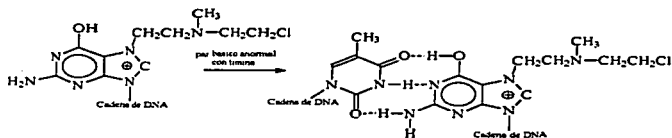


Figura 6: Apareamiento anormal de la guanina metilada con timina.

La alquilación del nitrógeno 7 labiliza al anillo de imidazol, haciendo posible la apertura del mismo o depuración por escisión de residuos de guanina como se puede observar en la figura 7, todo lo cual puede producir serios daños a la molécula de ADN; la escisión de la guanina da la formación de un hueco al que se le denomina brecha, en la cual puede entrar cualquier otra base, dando esto lugar a una transición o transversión (Garner E. 1991, Goodman Y 1980).

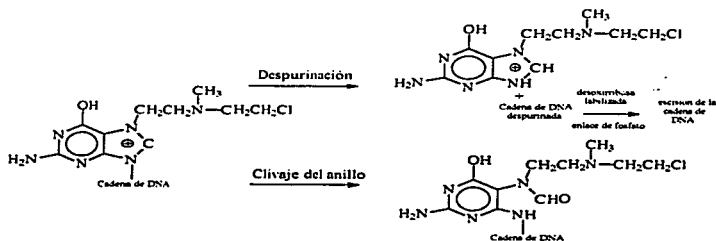


Figura 7: Labilización del anillo de imidazol de la guanina alquilada, produciendo la apertura del mismo o depuración por escisión de la guanina.



Con alquiladores bifuncionales como la mostaza nitrogenada la segunda cadena lateral de 2-cloroetilto puede experimentar una reacción similar de ciclización y alquilar un segundo residuo de guanina u otro resto nucleofílico como un grupo amino o un radical sulfhidrido de una proteína. Esto puede llevar a la doble ligadura cruzada de dos cadenas del ácido nucleico con una proteína por uniones covalentes muy fuertes reacciones que causarían gran daño a la función del ácido nucleico; ya que se impide la separación de las cadenas complementarias haciendo imposible la replicación (Garner E. 1991, Goodman Y. 1980).

Los agentes alquilantes también presentan radiomimetismo, es decir provocan rupturas cromosómicas al igual que las radiaciones ionizantes, más sin embargo la ruptura producida por los rayos X requiere de oxígeno, mientras que la que producen los agentes alquilantes no (Goldstein 1979, Kaina B. 1993).

El posible mecanismo que provoca la ruptura cromosómica parece ser por la formación de la  $O^6$ -metilguanina ya que al ser removida la base incorrecta se tiene la formación de una brecha en la cadena sencilla teniendo la posibilidad de que esta brecha pueda convertirse en ruptura de la doble cadena y por último en aberraciones cromosómicas estructurales (Galloway S. 1994).

#### 1.2.4.4.- Sistemas de reparación del daño producido en el ADN por los agentes alquilantes.

Las células bacterianas y de mamíferos pueden reparar un número limitado de cada lesión antes de la replicación del ADN, estos previenen mutagenicidad y eventos potencialmente letales (Salamanca F. 1990, Stanley E. 1988).

Los efectos mutagénicos y carcinogénicos de agentes alquilantes es debido a la generación de residuos de  $O^6$ -metilguanina que se aparean con timina, dando un cambio GC  $\rightarrow$  AT cuando el ADN es replicado. El daño inducido por la alquilación en el ADN es reparado básicamente por dos procesos:

1) **Transferencia directa de la modificación del grupo metilo.**

2) **Remoción de la base modificada por una glicosilasa (Ballantyne B. 1993, Miller J.1992, Salamanca F. 1990).**

1) **Transferencia directa de la modificación del grupo metilo.**

Es un tipo de reparación directa, en donde la lesión es removida por la enzima O<sup>6</sup>-metil guanina-metiltransferasa de peso molecular de 20,000 y que es codificada por el gene ada; la enzima reconoce a las O<sup>6</sup>-metilguanina en la cadena doble de ADN y remueve el grupo metil por transferencia a una cisteína de la enzima; la bioquímica de esta reacción resulta poco usual, ya que la enzima no se regenera, "una enzima nueva es utilizada para remover cada grupo metil", esta reacción es exactamente la misma en *E coli* que en los mamíferos, incluyendo al hombre (Ballantyne B. 1993, Salamanca F. 1990, Watson H. 1987).

2) **Remoción de la base modificada por una glicosilasa.**

En el caso de la reparación de la glicosilasa, se salva un sitioapurínico o aprimidico por la reparación de un proceso de escisión; en el que la glicosilasa rompe la unión del azúcar a la base dañada. El nucleótido reparado por escisión, normalmente esta implicado en la reparación de los aductos que distorcionan la doble hélice del ADN , después se repara la secuencia usando la cadena como un template (Ballantyne B. 1993, Beranek T. 1990).

Si *E. coli* es expuesta a bajas concentraciones de un agente atilante, un mecanismo de reparación es inducido a causa de incrementar resistencia a subsecuentes ataques con grandes dosis. Esta respuesta adaptativa fue descrita por primera vez por Samson y Cairns (1977) y fue revizada recientemente por Lindahl y colaboradores (1988). La vía de reparación esta particularmente bien entendida (Ballantyne B. 1993, Takasashi K. 1988).

La señal que provoca la inducción de esta respuesta es uno de los productos menores de la metilación de un metil-fosfotriester, por ejemplo, un producto formado en la 2-desoxirribosa del fosfato unido a la molécula de ADN (Ballantyne B. 1993).

La inducción de la resistencia a la muerte celular es debida a la ADN-glicosilasa que libera un espectro de bases dañadas del ADN en particular, 3- metiladenina, que puede bloquear de otra manera la replicación. Esta glicosilasa es codificada por el gen alk A<sup>+</sup> (Miller J. 1992, Takasashi K.1988).

La inducción a la mutagénesis es atribuida a la reversión de la O<sup>6</sup>-metilguanina por la reacción de transalquilación (Takasashi K. 1988).

La respuesta adaptativa es regulada por el gen ada, que también codifica para la alquiltransferasa. Esta proteína Ada tiene dos funciones una regulatoria y la otra como enzima reparadora (Ballantyne B. 1993, Takasashi K.1988).

#### 1.2.4.5.- Metil-metano-sulfonato.

El metil ester del ácido metilsulfónico es el metil-metano-sulfoato (MMS), y su fórmula estructural se muestra en la siguiente figura:

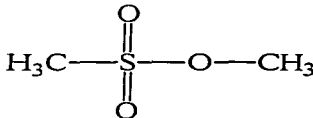


Figura 8: Estructura química del Metil-metano-sulfonato.

Es un líquido incoloro con un peso molecular de 110.3 y una densidad de 1.3 (The Merck Index 1989) Es un agente alquilante monofuncional con actividad neoplásica y mutagénica es un carcinógeno

directo, es decir, no requiere de la conversión metabólica para actuar como carcinógeno (Mittal A. 1990, Stanley E. 1988). Es usado únicamente como mutágeno en la investigación (como control positivo) (Derache R. 1990, The Merck Index 1989)

En cuanto al metabolismo del metil-metano-sulfonato en 1963 A. Barnsley reportó que en la orina recolectada durante las primeras 16 horas después de la administración de [  $^{14}\text{C}$  ]MMS por vía intravenosa, encontró metabolitos característicos de la biotransformación de la L-cisteína. El 80% de la reactividad excretada se encontraba contenida en metabolitos como ácido metilmercaptúrico, S-metil-L-cisteína, ácido-2-hidroxi-3-metilpropiónico, ácido metiltioacético, N-(metiltioacetil) glicina (Barnsley E. 1968).

El daño que produce el MMS al genoma es en una variedad de puntos por ejemplo sitios metil lábiles y produce mutaciones letales dominantes, traslocaciones heredables, mutaciones en locus específicos (a una baja frecuencia) micronúcleos e intercambio de cromátidas hermanas; al parecer las lesiones predominantes en el ADN resultan en la producción de  $\text{N}^7$ -metilguanina,  $\text{O}^6$  metilguanina y 3-metil-adenina. La inducción del rompimiento es predominantemente en fase S-dependiente (Rodríguez A. 1996). Los efectos propuestos sobre el ADN son alquilación, depurinación y rupturas de cadena sencilla e incluso formación de enlaces cruzados entre cadenas de ADN (Mittal A. 1990).

El MMS ha mostrado ser mutagénico en varios estudios *in vitro*, induce mutaciones en el gen hpt de células CHO y células V79 (Chaudhry M 1990, Koberle B. 1992). En células germinales de *Drosophila* produce muchas aberraciones cromosómicas, pero pocas mutaciones puntuales (Lee W. 1989). En estudios *in vivo* en mamíferos se ha mostrado que el MMS es mutagénico (Tao K. 1993), en el ratón, en células germinales induce tanto mutaciones letales dominantes como mutaciones en locus específicos (Ehling H. 1990). Sin embargo K.Tao y colaboradores en 1993 confirmaron que el MMS es más potente como clastógeno que como mutágeno y podría ser llamado o considerado como un super clastógeno de igual manera que se maneja que la etilnitrosourea es un super mutágeno. La carcinogenicidad del MMS

es probablemente el resultado de ese potencial clastogénico, ya que su porcentaje de actividad de mutágeno puntual es débil(Tao K. 1993).

La clastogenicidad de agentes monofuncionales puede resultar predominantemente por reaccionar con átomos de nitrógeno del ADN. Rodríguez y colaboradores (1996) reportan que los sitiosapurínicos actúan como mutágeno intermediario y es muy frecuente encontrarlos en la vía de agentes alquilantes con alta selectividad nucleofílica por ejemplo el MMS (Rodríguez A. 1996).

## 2.- MUTACION Y CANCER

Se ha relacionado desde hace tiempo el cáncer con una aberración del material genético que puede transmitirse. Esta idea fue cuestionada cuando por los años 50's se observó que carcinógenos conocidos como los hidrocarburos policíclicos, las aminas aromáticas, no causaban mutaciones en experimentos *in vitro* en microorganismos como las bacterias y las levaduras. Sin embargo, hacia 1970 se vió que si se añadía al medio una preparación de hígado de rata, rica en microsomas, es decir, rica en enzimas metabolizantes de xenobioticos, sí se producía el efecto mutagénico sobre los microorganismos. La aplicación de este test fue utilizado sobre todo por Ames y colaboradores (1973). La mayoría de los estudios concluyen que existe una correlación de un 90% entre carcinogénesis y mutagénesis (Derache R. 1990).

En 1978 la relación entre mutación y cáncer se estableció de forma definitiva, encontrándose involucrados un grupo de determinados genes. Al parecer esto abre el camino para estudios de ciertos virus infectados en aves y mamíferos. Estos virus tienen un genoma RNA pero pueden producir un ADN copia por una enzima llamada transcriptasa inversa y entonces integrar esa copia dentro del cromosoma del hospedero. Las cepas inductoras de tumores de esos virus son invariabilmente encontradas hasta después de haber adquirido un gen hospedero, en cualquier genoma este virus podría transferirse a un nuevo huésped. Sólo un número limitado de genes hospederos son efectivos, probablemente menos de 50 y en algunos casos virus no relacionados a tumores tendrían afinidad a estos genes aunque podría ser en regiones colindantes (Smith W. 1990).

Los genes efectivos son llamados oncogenes (genes que pueden producir cáncer) y son a través de éstos que se involucra el control de la división celular a nivel fundamental. Algunos de ellos son encontrados en organismos distanciados evolutivamente como la levadura y el ratón. Cuando genes hospederos dentro del virus son comparados con el mismo gen dentro de una célula normal, la copia viral tiene generalmente mutaciones puntuales o deleciones por arriba de los genes seleccionados. Siguiendo este indicio, en esos mismos genes es donde se observa que se inducen tumores por sustancias químicas no por virus. En varios casos donde se encontraron mutaciones, el que más se

encuentra es el oncogen ras, llamado así porque fue originalmente encontrado en el virus de la cepa Rasheed (Salamanca F. 1990, Smith W. 1990).

El gen ras ha sido clonado y secuenciado para un número de tumores espontáneos e inducido por agentes químicos, de tejido epitelial. En cada caso este tiende a mostrar que experimenta una mutación puntual simple, usualmente en el codon 12 pero también en los codones 13,59 ó 61. La proteína producto del gen ras es la encargada de mediar la acción de los factores de crecimiento, cuando se estimula la división celular los estudios atacan intensivamente a diferenciar con precisión entre las funciones de la proteína normal y la proteína ras mutante. Este tipo menor de tumor es reducido a un problema exclusivamente bioquímico (Watson H. 1987).

### 3.- ANTIMUTAGENOS

Las sustancias inhibitorias de la mutagenesis y carcinogenesis son de particular interés porque también contribuyen en la prevención del cáncer humano (Cairns D. 1993).

El término de antimutágeno ha sido utilizado para describir esos agentes que reducen la frecuencia o el porcentaje de mutación espontánea o inducida independiente del mecanismo involucrado (Otha T. 1993, Waters D. 1996), la habilidad del hombre y de otras especies animales es dependiente de los sistemas de detoxificación y antioxidantes. Esos dos sistemas de defensa están estrechamente relacionados y la superfamilia del citocromo P-450 y las isoformas de enzimas es un componente de ambos sistemas (Corinas de Nava C. 1990, Waters D. 1996). Las isoformas P-450 funcionan en el sistema de detoxificación como oxigenasas o como reductasas, y en el sistema antioxidante atrapando y neutralizado compuestos que generan radicales de oxígeno, radicales libres y oxígeno activo, entre las enzimas antioxidantes encontramos a la superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa, glutatión transferasa y a la catalasa (Ames B. 1993, Waters D. 1996).

Algunas drogas y componentes en la dieta pueden funcionar como antimutágenos, y estos son clasificados de acuerdo a su mecanismo de acción (Otha T. 1993, Watwrs D. 1996): Kada ha designado a los antimutágenos que actúan antes de la reacción de un mutágeno con el ADN como "dismutágenos". Estos incluyen factores que químicamente o enzimáticamente inactivan compuestos mutagénicos, compuestos de alto peso molecular como los son las fibras que absorben mutágenos, inhibidores de la acción metabólica de mutágenos, y agentes que interfieren con la generación química de mutágenos a partir de sus precursores, afectando la activación de los sistemas de detoxificación, interfiriendo con el metabolismo P-450 dependiente, éste parece ser el mecanismo más selectivo por el cual los componentes de la dieta ejercen los efectos sobre el metabolismo de las drogas y la carcinogénesis (Otha T. 1993, Ramel C. 1986, Waters D. 1996).



En la mayoría de los casos, la inhibición puede ocurrir fuera de la célula, pero algunas acciones inhibitorias sobre la activación metabólica de los mutágenos puede ocurrir en el interior de la célula blanco. A la par del término dismutágeno, Kada ha propuesto el uso del término "biomutágeno" para los factores antimutagénicos que reducen la frecuencia de mutagenesis celular después de que el ADN ha sido dañado por mutágenos. Factores que suprimen la mutagénesis inducida por la radiación UV son generalmente considerados como biomutágenos (De flora S. 1988, Otha T. 1993).

Ramel y colaboradores también clasificaron a los inhibidores de mutagénesis de acuerdo a la etapa durante la cuál ejercen sus efectos protectores. la etapa 1 comprende a los inhibidores que actuan extracelularmente y la etapa 2 comprende agentes que actuan intracelularmente. Sin embargo los de la etapa 1 casi corresponden a los dismutágenos, más los atrapadores de especies reactivas de oxígeno son incluidos como inhibidores de la etapa 2 (Otha T 1993).

Un intento de disminuir el porciento de mutación en humanos y subsecuentemente a disminuir la incidencia de cáncer, puede ser identificando antimutágenos y anticarcinógenos e incrementar nuestra exposición a éstos, especialmente a través de la dieta (Ames B. 1983, Ramel C. 1986 ). En la dieta se conocen algunas sustancias con estas propiedades, como antimutagénicas se encuentran las porfirinas, los ácidos grasos, vitaminas, polifenoles y compuestos sulfhidrílos y como anticarcinogénicos las vitaminas A, E, C, compuestos sulfhidrílos, grasas, selenio, calcio y fibra (Hikoya H. 1988).

#### **4.-RADICALES LIBRES**

Un radical libre es cualquier especie atómica o molecular que tiene uno o más electrones no apareados, es decir, un número total impar de electrones (Kager D.1990, Piña G. 1996, Pryor W. 1994). La tendencia espontánea de los electrones localizados en los átomos y moléculas es la formación de parejas, por lo tanto, la existencia de un electrón sin pareja, tal como aparece en los radicales libres, hace a dicha entidad química muy inestable, extraordinariamente reactiva y de vida efímera. Consecuencia de la inestabilidad y reactividad para combinarse, inespecíficamente en la inmensa mayoría de los casos, con la diversidad de moléculas integrantes de la estructura celular: (carbohidratos, lípidos, proteínas, ácidos nucleicos y derivados de cada uno de ellos). A su vez, la combinación de la molécula funcional con el radical libre da lugar a una molécula disfuncional, lo que puede repercutir en la vida celular (Piña G. 1996, Pryor W. 1994).

La prevalencia del oxígeno en sistemas biológicos (y la rapidez con que reacciona el oxígeno con los demás radicales orgánicos) hace que sea el centro de los radicales y el tipo más comunmente encontrado (Piña G. 1996).

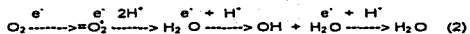
##### **4.1.- NATURALEZA RADICAL DEL OXIGENO MOLECULAR.**

El oxígeno molecular ( $O_2$ ) es fundamentalmente un birradical, ya que tiene dos electrones no apareados en su orbital externo, ambos con el mismo giro (paralelo) (Piña G. 1996, Wíngrove S. 1986), esto impide que capte dos electrones simultáneamente en las reacciones que interviene, puesto que un donador de un par de electrones cede necesariamente un par antiparalelo; por ésta razón, el oxígeno sólo puede intervenir en reacciones univalentes y aceptar los electrones de uno en uno. Por lo mismo, muchas enzimas de tipo oxidasas y de las oxigenasas contienen metales de transición en su sitio activo, puesto que éstos son capaces de aceptar y de donar electrones únicos (Piña G. 1996).

La mayor parte del oxígeno utilizado por el organismo humano es reducido a agua por la acción del complejo citocromo-oxidasa de la cadena respiratoria mitocondrial, según la siguiente reacción global:



En realidad y por las razones expuestas anteriormente, ésta reducción se hace en cuatro pasos univalentes:



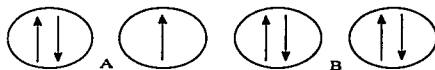
En donde  $\text{e}^-$  = electrón,  $\text{H}^+$  = hidrogenión,  $\text{O}_2^{\cdot -}$  = radical anión superóxido o radical superóxido,  $\text{H}_2\text{O}_2$  = peróxido de hidrógeno,  $\text{OH}^{\cdot}$  = radical hidroxilo,  $\text{H}_2\text{O}$  = agua.

Estos intermediarios quedan unidos al sitio activo de la citocromo oxidasa y no se difunden al resto de la célula en condiciones normales (Piña G. 1966, Pryor W. 1994).

#### 4.2.- RADICALES LIBRES DE OXIGENO

Las reacciones redox ocurren durante el transporte de electrones en los organelos celulares o en las membranas y son responsables de la generación de los radicales libres de oxígeno. Las mitocondrias, peroxisomas, el núcleo, el retículo endoplásmico y membranas plasmáticas son los sitios de formación de los radicales de oxígeno bajo condiciones fisiológicas (Karger D. 1990).

Cuando la molécula de oxígeno acepta un electrón, se convierte en un radical con carga negativa, el anión superóxido. Este se representa con el signo negativo de la carga aniónica, y un punto que indica que se trata de un radical y que por lo tanto, contiene un electrón no apareado  $\text{O}_2$  la representación de los vectores magnéticos se puede ver en la figura 9 (Karger 1990, Piña G. 1996).



**Figura 9: Representación de los vectores magnéticos de los electrones no apareados del radical anión superóxido . Nótese que el oxígeno ha sufrido una reducción univalente por captación de un electrón, pero sigue siendo un radical pues tiene un electrón no apareado. B: peróxido de hidrógeno que ya no es un radical, pues en cada orbital hay dos electrones de giro antiparalelo. (Galloway S. 1994).**

El segundo producto de la reacción (2),  $H_2 O_2$  , no es realmente un radical, pero su importancia estriba en que por captación de un electrón y de un protón puede dar lugar a la formación de una molécula de agua y a un radical hidroxilo  $OH$  , cuya estructura electrónica se representa con los vectores magnéticos en la figura 10 (Orrenius S. 1993, Piña G. 1996).



**Figura 10 .Estructura de los vectores magnéticos del radical hidroxilo que se produce en la reducción univalente a partir de peróxido (Galloway S. 1994).**

Por otro lado, el oxígeno molecular puede absorber energía (22 Kcal/mol) y convertirse en una molécula sumamente reactiva, el singlete de  $O_2$  , representado gráficamente como  $^1O_2$  \* y cuya estructura electrónica se representa con los vectores magnéticos en la figura 11..



Figura 11 .El singlete  $^1O_2$  \* llamado así porque su espectro se caracteriza por dar una sola señal, no es realmente un radical, ya que los dos electrones no apareados se han unido, formando un par antiparalelo. Es sumamente inestable y muy reactivo (Piña G. 1996).

Por absorción de otras 15 Kcal/mol, este singlete puede convertirse en otro, representado gráficamente como  $^1O_2$  \*\* cuya vida es efímera y se convierte rápidamente en el singlete  $^1O_2$  \* . La representación magnética se puede ver en la figura 12 .



Figura12: El singlete  $^1O_2$  \*\* tampoco es un verdadero radical, puesto que uno de sus electrones ha invertido su giro y es antiparalelo.

Debe notarse que en la formación de los singletes no hay adición de electrones sino que se trata realmente de redistribución de los mismos en el último orbital.

En la figura 13 se resumen las diferentes modificaciones que puede sufrir el oxígeno molecular para dar especies moleculares que son verdaderos radicales o que en el curso de su metabolismo dan origen a un radical.

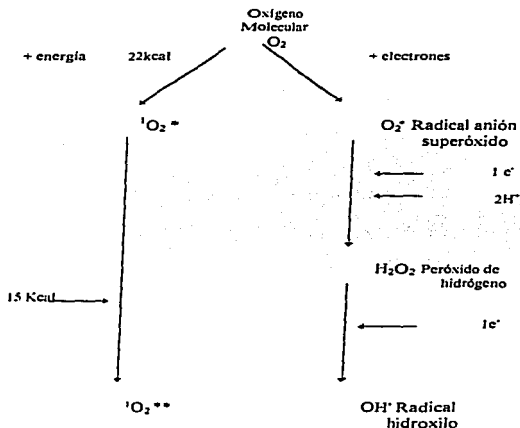


Figura13: Resumen de los cambios que puede sufrir el oxígeno molecular estable por reducciones univalentes sucesivas o por captación de energía.

#### 4.3.- ORIGEN CELULAR DE LOS RADICALES LIBRES.

Un número de orígenes intracelulares de radicales y oxidantes ha sido identificado como se muestra en la 14. La importancia de cada origen en algún desorden específico es a menudo desconocido, y el relativo papel que juega cada uno en el daño del tejido parece que varía con las condiciones experimentales empleadas. La formación de los radicales libres es probable que sea un proceso secundario a una enfermedad primaria (Piña G. 1996).

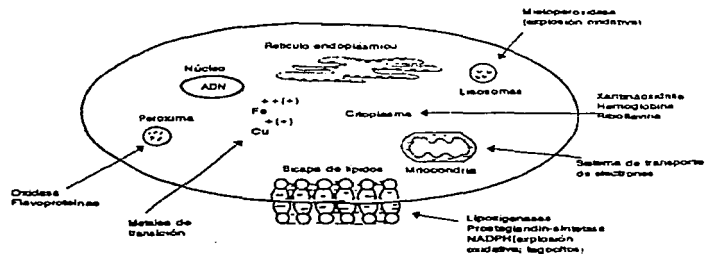


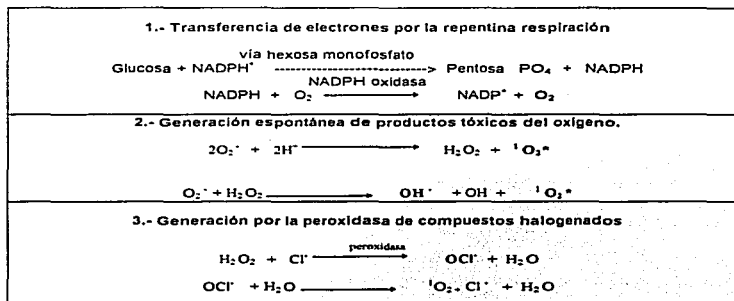
Figura 14: Orígenes intracelulares de los radicales libres. Todas las células aeróbicas producen radicales libres a través de la acción de enzimas solubles y unidas a la membrana.

#### 4.3.1.- Fagocitosis.

Quizás el origen biológico de los radicales libres mejor reconocido son las células fagocitarias, por ejemplo neutrófilos y monocitos. Cuando se activa la fagocitosis, las células exhiben un marcado incremento en el consumo de oxígeno, este proceso con es probablemente la fuente más importante de radicales superóxido *in vivo* (Pryor W. 1994).

Los radicales libres derivados del oxígeno desempeñan una función importante como oxidantes microbicidas así como mediadores de la inflamación y lesiones tisulares. Gran parte del oxígeno consumido por las células fagocitarias estimuladas se convierten directamente en aniones superóxido por la enzima NADPH oxidasa. El superóxido se convierte rápidamente en peróxido de hidrógeno y radicales hidroxilo, que producen la mayor parte de la actividad microbicida del fagosoma y el ambiente extracelular. En presencia de la mieloperoxidasa que procede de los gránulos citoplasmáticos de los neutrófilos, se transforman los peróxidos de hidrógeno y haluros en oxidantes adicionales tales como el ácido hipocloroso y cloruro libre (Piña G. 1996, Pryor W. 1994, Sites T. 1993).

Tabla 2.- Generación de productos tóxicos de oxígeno por el estallido respiratorio de los fagolisosomas de los leucocitos.





#### 4.3.2.- Sistema mitocondrial de transporte de electrones.

La membrana mitocondrial es capaz de generar especies reactivas de oxígeno tanto *in vivo* como *in vitro*. Las especies generadas son el anión superóxido y seguido de la dismutación de este, el peróxido de hidrógeno. El porcentaje de producción de las especies reactivas de oxígeno es directamente proporcional a el porcentaje de oxígeno mitocondrial utilizado *in vitro* y puede ser alterado en respuesta al ataque de varios tóxicos, incluyendo cambios en el pH o en el medio iónico de la mitocondria.

El origen mitocondrial de las especies reactivas de oxígeno involucra a la NADH-coenzima Q (complejo I), succinato-coenzima Q (complejo II), y/o QH<sub>2</sub> - citocromo c reductasa (complejo III). Una proteína no heme con ión sulfuro parece involucrada en el transporte de electrones al oxígeno en cada sitio (Karger 1990, Pryor W. 1994).

#### 4.3.3.- Sistema microsomal de transporte de electrones.

En el retículo endoplásmico se ha encontrado una familia de enzimas oxidasas con función mixta, de las que se propone que oxidan varios xenobioticos y sustancias endógenas, catalizando esas reacciones por el uso particularmente de especies de oxígeno generadas a través de la donación de electrones para el NADP(P)H. Aunque bajo condiciones normales no se obtiene la mayor contribución, el disturbio de procesos normales a través del daño o de la presencia de un xenobiótico puede cambiar grandemente este origen de radicales libres, resultando en modificaciones químicas de estructuras circundantes (Karger 1990).

#### 4.3.4.- Enzimas oxidasas solubles.

Existen numerosas enzimas solubles que pueden oxidar substratos endógenos y exógenos y generar especies reactivas de oxígeno. Estas incluyen a la xantina oxidasa, la dopamina, la  $\beta$ -hidroxilasa, la D-amino ácido oxidasa, la urato oxidasa . Con excepción de la xantina oxidasa y la dopamina  $\beta$ -hidroxilasa las enzimas antes mencionadas no han sido bien estudiadas en términos de

toxicología de radicales libres, y su contribución de daño tisular. La xantina oxidasa, existe y es sintetizada en prácticamente todos los tejidos y puede reducir directamente al oxígeno molecular en superóxido y peróxido de hidrógeno (Karger 1990, Piña G. 1996, Pryor W. 1994).

#### 4.3.5.- Autooxidación de substratos endógenos o exógenos.

Los radicales libres son generados por la oxidación de varios compuestos químicos. La autooxidación de epinefrina ha sido usada para generar radicales libres en una variedad de situaciones experimentales. Este proceso puede llevar a dañar el tejido en un órgano aislado o sistemas celulares, pero este papel *in vivo* es indeseable. La reducción enzimática es seguida por una autooxidación que puede resultar en una reacción cíclica (ciclo redox) que produce una gran cantidad de radicales libres, esta vía usualmente involucra quinonas y ha sido estudiada en varios sistemas (Orrenius S. 1993, Pryor W. 1994).

#### 4.3.6.- Metales de transición.

La actividad redox de metales de transición, como el hierro y el cobre, es esencialmente como cofactores enzimáticos. Cuando son liberados en los sistemas biológicos estos iones pueden también facilitar la transferencia de electrones a macromoléculas como lípidos, proteínas y ADN. En suma estos metales pueden catalizar la descomposición de peróxidos orgánicos existentes (Kager 1990, Orrenius S. 1993, Pryor W. 1994).

### 4.4.- REACTIVIDAD DE LOS RADICALES EN LOS SISTEMAS BIOLÓGICOS

La exposición de los radicales libres y oxidantes a los tejidos en una variedad de sistemas ha documentado la habilidad de éstas especies para producir daño. Como se ha mencionado ya previamente, los lípidos, proteínas y el ADN son capaces de reaccionar con radicales y oxidantes, y un

enorme número de cambios se han identificado que podrían proporcionar una explicación al mecanismo por el cual resulta el daño celular o tisular. La relativa contribución de cada uno de esos cambios en algún modelo específico parece funcionar solo para unos cuantos. En general parece que la acumulación de los múltiples efectos inducidos por los radicales libres es la causa de la muerte celular, más que el efecto directo de toxinas no específicas como los agentes alquilantes (Burk D. 1991, Sherwin E. 1990).

#### 4.4.1.- Lípidos.

Los fosfolípidos de las membranas contienen una gran cantidad de ácidos grasos poliinsaturados, muy vulnerables a la peroxidación, esta oxidación se presenta cuando se expone al lípido al calor, luz, iones metálicos y oxígeno, generando radicales libres (Burk D. 1991, Orrenius S. 1993, Sherwin E. 1990).

Los efectos deletéreos son iniciados por los radicales libres, el radical hidroxilo (OH ) al atacar los ácidos grasos insaturados, sustrae un átomo de hidrógeno y crea un nuevo radical orgánico el cual es mostrado en la figura 15A (Martin W. 1986, Orrenius S. 1993).

Este radical orgánico es estabilizado por un rearrreglo interno que produce un dieno conjugado, el cual reacciona rápidamente con  $O_2$  para dar un radical peroxilo o dióxido como se muestra en la figura 15B.

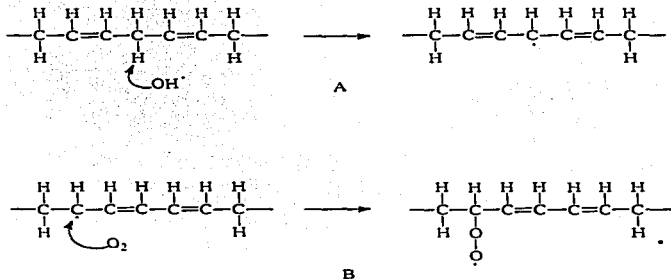


Figura 15: A: El radical hidroxilo, al atacar un ácido graso insaturado, sustrae un átomo de hidrógeno y crea un nuevo radical orgánico (centrado en el átomo de carbono). B: Por un rearrreglo interno, se produce un dieno conjugado que puede reaccionar con oxígeno molecular para dar un radical peroxilo (o dióxido).

El radical lipoperoxilo puede atacar un lípido vecino, sustrayendo un átomo de hidrógeno para producir un hidroperóxido y un nuevo radical (propagación) como se muestra en la figura 16A. Los hidroperóxidos lipídicos son estables en estado puro, pero en presencia de metales de transición (hierro y cobre) se descomponen, dando un radical alcohoxilo el cual se muestra en la figura 16 (Burk D. 1991, Esterbauer H. 1990, Orrenius S. 1993).

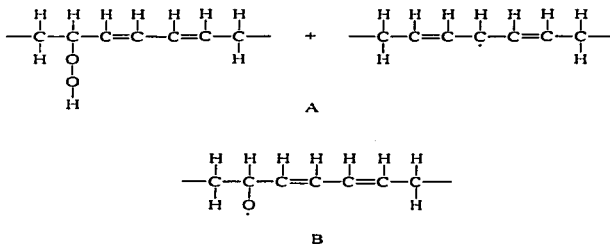


Figura 16: A(arriba), el radical peroxilo puede atacar a un lípido vecino, sustrayendo un átomo de hidrógeno para dar un hidroperóxido y un nuevo radical orgánico (propagación del daño). B (abajo), los hidroperóxidos lipídicos son estables pero en presencia de metales de transición (hierro o cobre), descomponen dando un radical alcohoxilo (propagación del daño).

Tanto los radicales peroxilos como alcoholilos estimulan la reacción en cadena al sustraer átomos de hidrógeno de otros lípidos (propagación). Es posible que el singulete de oxígeno  $^1O_2$  sea también un iniciador de la reacción de lipoperoxidación, sobre todo en presencia de pigmentos orgánicos. Esto sucede mucho *in vivo* en el ojo de los mamíferos, en cloroplastos y en los pacientes de porfiria. Se ha comprobado que la hepatotoxicidad producida por el tetracloruro de carbono, el halotano, la isoniacida y la bleomicina, tiene como uno de sus factores importantes de lipoperoxidación (Orrenius S. 1993, Pryor W.1994).

#### 4.4.2.- Proteínas.

En años recientes se ha incrementado el interés de las proteínas como blancos para los radicales libres. Las proteínas oxidadas son mucho más susceptibles a la proteólisis y la acumulación de grupos carbonilo en la proteína parece incrementarse con la edad. El incremento de proteínas oxidadas puede relacionarse con la edad y la pérdida de funciones bioquímicas y fisiológicas selectivas, y puede reflejar la no reparación de un daño de otra macromolécula como el ADN (Pryor W. 1994).

#### 4.4.3.- ADN

Un mecanismo hipotético que explica la muerte celular después de la exposición de especies reactivas de oxígeno es en el que participa la enzima poli (ADP-ribosa) polimerasa, la cual es activada después de que los peróxidos han dañado al ADN. Una vez activada, la poli (ADP-ribosa) polimerasa utiliza grandes cantidades de nicotinamida adenindinucleótido (NAD) para reparar el ADN dañado por especies reactivas de oxígeno. La disminución del NAD sugiere que la célula activa su capacidad para producir ATP, lo que conduce posteriormente a un déficit de energía, cambios en la homeostasis del calcio, y finalmente la muerte celular. Aunque este concepto no es muy adecuado para explicar el daño oxidativo, es claro que las especies reactivas de oxígeno pueden dañar vías críticas para el mantenimiento de las condiciones normales de nucleótidos de pirimidina y adenina. Ya que esos

nucleótidos son necesarios para el funcionamiento normal de muchas enzimas, células afectadas, si no es que dañadas, pueden ser mucho más susceptibles a otro stress. (Kager D. 1990, Pryor W. 1994).

La interacción de las especies reactivas de oxígeno con el ADN parece afectar la regulación de ciertos genes. Esas modificaciones pueden involucrar modificaciones directas al ADN, o estos pueden ser mediados a través de cambios en la expresión del gen de regulación. Muchos de los trabajos sobre los efectos de la expresión de genes han sido conducidos por investigadores interesados en el papel de las especies reactivas de oxígeno en la carcinogénesis (Orrenius S. 1993, Pryor W. 1994).

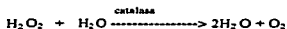
#### 4.5.- DEFENSAS BIOLÓGICAS CONTRA LOS RADICALES LIBRES DE OXÍGENO.

La vida en presencia del oxígeno molecular exige contar con una batería múltiple de defensa contra los diversos radicales libres de oxígeno que por un lado tiende a impedir su formación y por otro, los neutralice una vez formados, estas defensas se efectúan en cinco niveles (Kager 1990, Piña G. 1996).

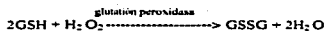
El primer nivel consiste en evitar la reducción univalente del oxígeno mediante sistemas enzimáticos capaces de efectuar la reducción tetravalente consecutiva sin liberar los intermediarios parcialmente reducidos. Esto lo logra con gran eficiencia el sistema citocromo-oxidasa de la cadena respiratoria mitocondrial, reponsable de más del 90% de la reducción del oxígeno en el organismo humano (Martín. W 1986, Piña G. 1996).

El segundo nivel lo constituye la presencia de enzimas especializadas en captar el radical anión superóxido ( $O_2^{\cdot -}$ ). Estas son la superóxido dismutasas (SOD), metaloenzimas que catalizan la dismutación del radical anión superóxido para dar oxígeno molecular y peróxido de hidrógeno, con una eficiencia tan grande que se acerca al límite teórico de la difusión. En las células de los organismos eucarióticos existen dos. Una es citoplásmica y contiene un átomo de  $Cu^{2+}$  y uno de  $Zn^{2+}$  en su sitio activo. La otra SOD es mitocondrial y contiene  $Mn^{3+}$  en su sitio activo (Martín W. 1986, Piña G. 1996, Pryor W. 1994).

El tercer nivel de defensa está dado por un grupo de enzimas especializadas en neutralizar al peróxido de hidrógeno (Piña G. 1998). Entre ellas está la catalasa que se encuentra en los peroxisomas; ésta enzima es una hemoproteína que posee actividad peroxidásica; realiza una reacción de dismutación en la que utiliza al peróxido de hidrógeno como sustrato donador de electrones y otra molécula de peróxido de hidrógeno como oxidante o aceptor de electrones la reacción es: (Martín W. 1986).



Además se cuenta con las peroxidasas que catalizan la reducción del peróxido de hidrógeno por diversos donadores de electrones. En los mamíferos, la glutatión peroxidasa (una enzima citoplásmica que contiene selenio) es la más importante, cataliza la siguiente reacción:



(donde GSH= glutatión reducido) y GSSG= glutatión oxidado). (63.65).

El glutatión GSH, puede captar también el radical hidroxilo y el singulete de oxígeno (Pryor W. 1994).

Muchas proteínas, pero sobre todo la albúmina, pueden ser captadoras de radicales libres de oxígeno, en este proceso la proteína se transforma en una proteína anormal. Las proteínas modificadas por los radicales libres de oxígeno son degradadas a una velocidad mayor que las proteínas normales, por enzimas proteolíticas, por lo que esta actividad es considerada "suicida" (Karger 1990, Piña G.1996).

Una vez producido el daño molecular, existe un quinto nivel de defensa que consiste en la reparación. La mayor parte de las moléculas del organismo sufren un recambio constante, por lo cual son periódicamente reemplazadas con lo que puede desaparecer el daño. En el caso del material genético, los radicales libres de oxígeno son capaces de provocar rupturas en la cadena del ADN y aún



de inducir mutaciones, intercambio de cromátidas hermanas, aberraciones, citotoxicidad, carcinogénesis celular, (Cerruli P. 1985, Orrenius S. 1993, Piña G. 1996) pero existen mecanismos enzimáticos de reparación que permiten restablecer la información genética (Piña G. 1996, Salamanca F. 1990). Se ha calculado que, en promedio, pueden ocurrir 1000 casos de ataques oxidantes al ADN por célula por día en el organismo humano (Kager 1990, Piña G. 1996). La importancia de los mecanismos de reparación del ADN es evidente en algunos errores congénitos del metabolismo, por ejemplo, el síndrome de Bloom, en el que existe una deficiencia congénita de la enzima ADN-ligasa 1, no se reparan las cadenas rotas y esto resulta en inestabilidad genética y aumento del riesgo de cáncer. En el xeroderma pigmentoso, la deficiencia genética estriba en la enzima que elimina las bases de timina modificadas en el ADN, con el resultado de una hipersensibilidad a la luz solar y una mayor incidencia del cáncer de piel (Garner S. 1991, Piña G. 1996, Salamanca F. 1990).

#### 4.6.- ENFERMEDADES RELACIONADAS CON LA ACCION DE LOS RADICALES LIBRES.

Los radicales libres son especies de extrema reactividad, producidas continuamente en el interior de las células, ya sea como mecanismos fisiológicos, o como subproductos accidentales de varios procesos metabólicos, y que difunden a través de las membranas celulares. Cuando las tasas de formación de estos radicales rebasan a los mecanismos antioxidantes normales, ocurre oxidación molecular desmedida, de consecuencias potencialmente letales a la larga para las células, y al organismo entero (Frenk S. 1996, Orrenius s. 1993).

La lista de condiciones clínicas asociadas con radicales libres continúa aumentando. Esto es en parte debido a la habilidad de los radicales libres de inducir estados patológicos que parecen ser de un amplio rango de enfermedades, se desconoce mucho de lo que rodea a la patogénesis de numerosos desórdenes (Pryor W. 1994); esto en virtud de su cortísima vida media y su naturaleza fugaz casi intangible (Frenk S. 1996).

En la tabla siguiente se muestran los padecimientos clínicos que presuntamente son asociadas a radicales libres de oxígeno.

Tabla 3. Padecimientos clínicos supuestamente asociadas a radicales de oxígeno.

<b>Aparato cardiovascular</b>	<b>Otras hemopatías</b>	<b>Aparato digestivo</b>
Aterosclerosis	Drepanocitosis	Hepatopatía endotóxica
Cardiopatía alcohólica	Anemia de Fanconi	Id. Por hidrocarburos hidrogenados
Id. Por adriamicina	Saturnamo	Pancreatitis aguda
	Favismo	Gastritis por antiinflamatorios no esteroides
<b>Estados de isquemia repurflusión</b>	Malaria	
Accidente cerebrovascular	Farmacológicas	
Infarto miocárdico, arritmias	Carcinogénesis	Sistema nervioso
Transplante de viscúles	Radiaciones ionizantes	Enfermedad de Parkinson y Alzheimer
Artritis	Accidentales	Lipofuscionosis, ceroidosis
Congelación	Radioterapia	Neurotoxicas
		Esclerosis múltiple
<b>Lesiones inflamatorias de orden inmunológico</b>	<b>Síndromes diabéticos</b>	Lesión cerebro vascular hipertensiva
Glomerulonefritis idiopáticas o membranosas	Deficiencias nutricionales	
Viscúculis por virus de hepatitis B o por medicamentos	Cuesorcor	<b>Riñón</b>
Artritis reumatoide	Alcoholismo	Nefrototoxicidad por aminonucleósido
	Enfermedad de Keshan (selenio)	Síndrome nefrótico autoimmune
<b>Sobrecarga de hierro</b>	Envejecimiento	Intoxicación por metales pesados
Hemocromatosis idiopática	<b>Aparato respiratorio</b>	
Dietaria (en Bantius)	Contaminantes oxidantes (O, NO), otros (SO <sub>2</sub> )	<b>Ojo</b>
Talasemias y otras anemias crónicas hiperfundidas	Humo de tabaco	Fibrosis retrolental
Alcoholismo	Hiperoxia	Catarata
	Displasia broncopulmonar	Hemorragia intraocular
<b>Músculo</b>	Efiama	Retinopatía fótica
Algunas miostrofias	Neuromocnosis	
	Intoxicación con paraquat	<b>Piel</b>
		Radiación actínica
		Lesión térmica
		Algunas porfirias
		Dermatitis por contacto

Como se puede apreciar es extensa la lista de padecimientos relacionados con los radicales libres, y sólo se revisará el de carcinogénesis en base al propósito del presente trabajo.

#### 4.6.1.- Carcinogénesis.

Es conocida la habilidad de las radiaciones ionizantes de estimular el desarrollo del cáncer. Parte del daño puede radicar en la absorción directa de energía por el ADN con la consecuente alteración de su estructura. Sin embargo, la mayor parte de la radiación es absorbida por el agua que, por representar

el 70% de un organismo, resulta ser su principal blanco y conduce a la formación de radicales de oxígeno. El ataque de estos radicales y sus derivados al ADN y a otras partes de la célula puede ser la base del cáncer inducido por las radiaciones (Orrenius S. 1993, Piña G.1974, Pryor W. 1994).

La teoría de la carcinogénesis en dos etapas, la iniciación y la promoción, explica algunas observaciones que implican a los radicales libres de oxígeno en este proceso. Así , por ejemplo, algunos promotores tumorales como los ésteres de forbol son activadores muy efectivos de la descarga oxidativa de los fagocitos (Goldstein B. 1989, Gonzalez B. 1989:Pryor W.1994). Esta activación de los fagocitos también resulta en la liberación de una mezcla compleja de citocinas entre las que se encuentra un factor clastogénico (fraccionador del ADN) difusible. El daño al ADN producido por los radicales libres de oxígeno, por el factor clastogénico o por otros mediadores de la inflamación puede activar oncogenes o inactivar genes supresores de tumores como p53 (González B. 1989, Piña G 1996,Pryor W. 1994)

Como evidencia indirecta adicional del papel de los radicales libres de oxígeno en la carcinogénesis se tiene la asociación conocida entre el cáncer y diversos padecimientos genéticos e inflamatorios crónicos, por ejemplo, la colitis ulcerativa y el mayor riesgo de desarrollar adenocarcinoma del colon, la cirrosis hepática y el carcinoma hepatocelular, la ataxia telangiectasia, la anemia de Fanconi y el síndrome de Bloom (todos los cuales presentan un metabolismo anormal del oxígeno) y una mayor incidencia al cáncer (Argarwal R. 1991 Galloway E. 1996). Sin embargo, no hay evidencias concluyentes directas de que los radicales de oxígeno sean factores principales en la iniciación o en la promoción del cáncer (Garner E. 1991).

## 5.- ANTIOXIDANTES

Los antioxidantes son los agentes protectores más estudiados para la prevención de enfermedades, puesto que estos compuestos liberan a la célula directamente de reactivos oxidantes (Kuroda Y. 1992, Otha T. 1993).

### 5.1.- ANTIOXIDANTES NATURALES

Estudios epidemiológicos indican que la dieta es un factor que puede modificar el desarrollo de algunos tipos de cáncer y de enfermedades degenerativas. Las frutas y los vegetales son las mejores fuentes de varios antioxidantes, vitaminas y micronutrientes. Los tocoferoles, carotenos, ácido ascórbico son antioxidantes presentes en diversos alimentos (Cerruti P. 1985).

#### 5.1.1.- Vitamina E.

El nombre genérico para todos los tocoferoles y derivados es el de vitamina E. En el humano, el más abundante es el  $\alpha$ -tocoferol seguido del  $\gamma$ -tocoferol; el requerimiento diario para un hombre y mujer adultos son de 10 y 8 mg de  $\alpha$ -tocoferol por día respectivamente, las fuentes más ricas de vitamina E en la dieta humana son la margarina, la mayonesa, el aceite vegetal, la mantequilla y el huevo (Pryor W. 1994).

La vitamina E actúa como antioxidante atrapando radicales libres, puede actuar directa o indirectamente en la iniciación ( $^1O_2$ ,  $O_2^-$ , OH) o en la propagación (radical lipoperoxilo) en la oxidación de la cadena lipídica (Otha T. 1993, Pryor W. 1994), el tocoferol también puede reaccionar con el óxido nítrico; en la clínica se ha utilizado a la vitamina E en enfermedades cardíacas producidas por oxidación, provocada por las quinonas adriamicina y deunomicina (Kurudoa Y. 1992, Pryor W. 1994).

### 5.1.2.- Carotenoides

La mejor fuente de carotenoides son las frutas y los vegetales; por ejemplo las zanahorias, el tomate, el brocoli, la naranja y el mango, se puede hallar también carotenoides en la piel de los animales.

Los carotenoides han mostrado ser atrapadores de radicales de oxígeno y pueden proteger contra la fotosensibilización provocada por la luz y contra la peroxidación de lípidos. Los mecanismos conocidos por los que los carotenoides protegen a las células del daño oxidativo son: extracción de un átomo de hidrógeno o un electrón de varias moléculas, atrapando singuletes de oxígeno, produciendo esta reacción un triplete carotenolde excitado, y atrapando radicales lipoperoxilo, ocasionando una baja en la presión de  $O_2$ .

### 5.1.3.- Vitamina C

El ácido ascórbico o vitamina C, esta presente en muchos fluidos corporales, es requerido en la dieta de los humanos, monos, cerdos y otros animales porque no lo sintetizan. La recomendación diaria de vitamina C para el hombre y la mujer es de 60 mg por día. Los vegetales y frutas contienen considerables cantidades de ascorbato; por ejemplo: el brocoli, las espinacas, el tomate, el ajo, las papas y frutas cítricas (Cerrull P. 1990, Otha T. 1993).

La vitamina C es un eficiente atrapador de radicales libres ( $\dot{O}_2$ ,  $^1O_2$ ), aunque el ascorbato se presenta en fase acuosa puede proteger a los lípidos y las membranas del daño oxidativo por atrapamiento de radicales lipoperoxilo. Reduce la carcinogenicidad de las nitrosaminas y presenta actividad antitumoral en roedores expuestos a luz ultravioleta (Karger 1990, Pryor W. 1994).

#### 5.1.4.- Flavonoides

Los flavonoides son un gran grupo de compuestos polifenólicos que están ampliamente distribuidos en los alimentos de consumo humano. La mejor fuente son los pigmentos rojos y amarillos de los vegetales, en frutas (manzanas, limones, naranjas) y en vegetales (coliflor, papas). Su estructura fenólica presenta actividad antioxidante hacia una variedad de sustancias fácilmente oxidables, inhibe la lipoperoxidación atrapando radicales involucrados en la iniciación como hidroxilo, anión superóxido, el singulete de oxígeno, se une a metales iónicos, atrapa al radical lipoperoxilo; e inhibe enzimas responsables de la producción de radicales libres (De flora S. 1988, Pryor W. 1994).

#### 5.2.- ANTIOXIDANTES SINTETICOS.

En la industria alimenticia un elemento indispensable hoy en día son los aditivos para retrasar o inhibir la oxidación de las grasas y aceites que contienen los productos y así evitar la rancidez de éstos, logrando prolongar el tiempo de vida de anaquel de los alimentos. Los antioxidantes empleados son: el galato de propilo muy soluble en agua, el butilhidroxitolueno (BHT), el butilhidroxianisol (BHA), el butilhidroxitolueno (BHT) que son solubles en grasas y aceites (Ballantyne B. 1993, Pryor W. 1994).

#### 5.3.- ACIDO NORDIHIROGUAYARETICO

El ácido nordihidroguayarético (ANDG) como se muestra en la figura 17 es un lignano simple y un antioxidante fenólico, que se encuentra en el exudado resinoso de *Larrea divaricata* y *Larrea tridentata*, la primera se localiza en Argentina, Bolivia, Chile, Perú; y en el suroeste de Estados Unidos y norte de México la segunda (Campos L. 1981, Martínez M. 1989).

Se obtuvo por primera vez de forma sintética en 1918 por reducción y desmetilación del ácido guayarático constituyente de la goma del guayacum (Oliveto E. 1972).

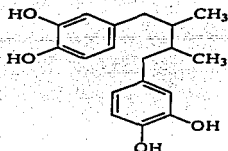


Figura 17: Estructura química del ácido nordihidroguayárico.

Se utilizó como antioxidante en grasas de origen animal, aceite vegetal y productos lácteos por muchos años en concentraciones de 0.01- 0.1% (Vogel W. 1994); sin embargo a finales de los 60's estudios de toxicidad indicaron que produce quistes en corteza y médula renal en ratas con una ingesta mayor del 3% del compuesto durante 6 semanas; por lo que la U.S. Food and Drug Administration lo removió de la lista de compuestos de seguridad reconocida (Goodman T 1970, Grice H. 1968).

A pesar de los indicios de toxicidad se encuentra en Europa como aditivo de crema para manos (rache J. 1992), además los nativos de las regiones en donde crece la Larrea lo utilizan en heridas y escoriasiones de la piel en forma de cataplasmas para aliviar dolores; lo ingieren como diurético y para disolver cálculos renales y de vesículas aunque no hay evidencias científicas que comprueben estas propiedades.

Por contradictorio que parezca ha surgido en los últimos años un interés creciente por estudiar las actividades biológicas del ANDG.

El ANDG tiene propiedades antimicrobianas contra *Salmonella*, *Clostridium botulinum* (Mac Rae W. Reddy N 1982), actividad fungicida contra hongos como *Rhizotonia solani*, *R. oxysporum* y *Rhizopus nigra*ns (Campos L. 1981).

Debido a su estructura polifenólica que es la que determina la actividad antioxidante, se le ha relacionado como inhibidor de radicales libres (Nakayama T. 1992, Robison T. 1990), es un inhibidor de las enzimas que intervienen en la cascada del ácido araquidónico, la ciclooxigenasa y la lipoxigenasa y de los radicales libres que inician la peroxidación de la membrana lipídica, además bloquea indirectamente la acción de la fosfolipasa A<sub>2</sub> (Capedevila J. 1988, Robinson T. 1990). Inhibe las enzimas monooxigenasas dependientes del citocromo P-450, por lo que suprime la bioactivación de promutágenos y procarcinogénicos, que son activados por esta vía (Argawal R. 1991, Capedevila J. 1981).

Actúa como neuroprotector; protegiendo contra la toxicidad del péptido  $\beta$  amiloide, en cultivos de neuronas de hipocampo de ratas, al evitar la acumulación de especies reactivas de oxígeno y calcio extracelular (Goodman Y. 1994). El ANDG interviene en el control del crecimiento de líneas celulares cancerosas de pulmón por la interrupción de la 5-lipoxigenasa, *in vivo* la inhibición de la esta enzima da como resultado cambios en la programación de muerte celular (Igalii M. 1996).

Ha mostrado actividad antitumoral, inhibiendo la etapa inicial del desarrollo de tumores en plantas causadas por *Agrobacterium tumefaciens* (Wang Z. 1991).

El ANDG actúa en la fase de iniciación y promoción del tumor en ratones hembra Sencar inducidos por el 7,12 dimetilbenz(a)antraceno (iniciador) y el peróxido de benzoilo (promotor) (Wang Z. 1991). En ratones inhibe la promoción tumoral de piel inducida por el 12-O-tetradecanoilforbol-13- acetato (Nakadate T. 1992).

Es un agente quimiopreventivo del cáncer mamario en ratas (Sprague-Dawley) tratadas con N-metil N- nitrosoourea, se redujo la incidencia de cáncer mamario al ser tratadas con 0.1% de ANDG como componente de su dieta alimenticia (Mc Cormick D. 1987).

Proteje contra el daño en vejiga en ratones ICR Inducido por la ciclofosfamida; que al ser metabolizada provoca urotoxicidad (Frasier L. 1993)



El ANDG presenta efecto antimutagénico en estudios con *Salmonella typhimurium* cepas TA 100 y TA 98 tratadas con metil-metano-sulfonato, benzo (a) pireno y la aflatoxina B<sub>1</sub>, con y sin activación microsomal, encontrándose efecto protector (Wang Z. 1991).

En arterias coronarias de cerdo, el ANDG muestra tener actividad vasodilatadora y/o broncodilatadora y por los resultados obtenidos se cree que la estructura básica del ácido posee muchas posibilidades para tomarse como modelo y producir nuevos compuestos, más potentes y selectivos para esta actividad farmacológica (Norihiro N. 1996).

Se le han realizado estudios genotóxicos tanto *in vitro* como *in vivo*. En cultivo de linfocitos humanos de dos donadores sanos, se determinó el potencial genotóxico del ácido utilizando las concentraciones de un rango de 1.1  $\mu$ M a 27.0  $\mu$ M. Los resultados mostraron que el ANDG es un inductor de intercambios de cromátidas hermanas (ICHs), ya que el incremento esta relacionado al incremento de la dosis. En cuanto al efecto citotóxico evaluado con la cinética de proliferación celular y el índice mitótico se observó un decremento proporcional a las dosis utilizadas presentando diferencia estadísticamente significativa a la dosis más alta (27.0  $\mu$ M). En base a los resultados obtenidos se concluyó que el ANDG no presenta efecto citotóxico evidente, pero sí un efecto genotóxico por la inducción de ICHs (Ponce A. 1995).

En médula ósea de ratón cepa NIH, el análisis citogenético se realizó evaluado la frecuencia de ICHs, la cinética de proliferación celular, índice mitótico, y la frecuencia de aberraciones estructurales y numéricas. Se determinó la capacidad genotóxica utilizando un rango de 8.8 mg/Kg a 70 mg/Kg administrado vía i.p.; los resultados mostraron que el ANDG, es un inductor de ICHs conforme aumenta la dosis, sin embargo el incremento total no llega a duplicar el valor basal, lo que sugiere que la toxicidad es moderada. En lo referente a la cinética de proliferación celular se presentó una modificación del ciclo celular en la dosis más alta (70 mg/Kg), sin alterarse el tiempo promedio de generación. Con respecto al efecto citotóxico este se presentó en la dosis máxima. En relación a las aberraciones cromosómicas se observaron valores semejantes al testigo. Lo antes mencionado sugiere que el ANDG es un agente genotóxico moderado y citotóxico a dosis elevadas (Molina J. 1996).

## 6.- SISTEMAS DE PRUEBA

El ambiente en el que se desarrolla la vida moderna está peligrosamente contaminados en la actualidad se ha difundido el empleo de sustancias químicas para el control de plagas y el enriquecimiento de los suelos, el uso de numerosos agentes para preservar y conservar alimentos, la exposición ocupacional a sustancias nocivas, el impresionante desarrollo de la química y la farmacología penden sobre la humanidad la aterradora amenaza de la exposición accidental o por agresión bélica a la radiación, la energía atómica o a sustancias nocivas o deletéreas, y a la contaminación atmosférica y de las aguas aumenta en forma alarmante día tras día (Loomis T. 1985, Salamanca F.1990) . Existe una preocupación constante por las consecuencias que pueden tener todos los contaminantes sobre el hombre y los seres vivos. Aún cuando son muy variadas las vías por las que esos agentes pueden afectar los organismos, la mayor parte de los contaminantes que dañan a las células lo hacen a través de los cambios químicos que provocan al interactuar con las moléculas de mayor importancia biológica (Ballantyne B. 1993, Morales R. 1988). El efecto que dichos agentes pueden tener sobre moléculas de ADN, portadoras de la información genética, es quizás el más relevante por el papel biológico fundamental que éstas desempeñan y porque son insustituibles (Morales R. 1988, Salamanca F. 1990).

En base a lo anteriormente dicho es justificable y necesario el interés creciente en el desarrollo de métodos para detectar agentes genotóxicos, y desarrollar medidas adecuadas para prevenir cualquier exposición.(Salamanca F. 1990).

Se han implementado numerosos sistemas de prueba que permiten identificar la acción mutagénica tanto *in vivo*, como *in vitro*. Los métodos empleados con mayor frecuencia son los que aparecen en la siguiente tabla.

**Tabla 4 Sistemas de pruebas más utilizados para identificar la acción de genes mutagénicos.**

Células somáticas		Tipo de células	Células gaméticas
<i>In vitro</i>		<i>In vivo</i>	
<b>I. MUTACIONES GENICAS</b>			
Bacterias		Prueba de la mancha (spot test)	Recesivas letales
Levaduras			Pruebas de locus específico
Hongos			Anomalías del espermatozoide
Células en cultivo			
<b>II. CAMBIOS CROMOSOMICOS</b>			
Cultivo de fibroblastos		Micronúcleos	Dominantes letales
Cultivo de linfocitos		Médula ósea	Pérdida del X
			Translocaciones heredables
			Citogenética de espermatozoides
			Aneuploidías
			no (disyunción)
<b>III. INDICADORES DE DAÑO BIOLÓGICO</b>			
Síntesis de ADN no programada en células		Síntesis de ADN no programada en tejidos	Síntesis de ADN no programada
Rupturas del ADN		Rupturas del ADN	Rupturas del ADN
Intercambio de cromátidas hermanas (ICH)		ICH	ICH
Recombinación génica		Alquilación de hemoglobina	

#### 6.1.- INTERCAMBIO DE CROMATIDAS HERMANAS.

Los intercambios de cromátidas hermanas (ICHs), son intercambios de segmentos simétricos y equivalentes entre cromátidas de un mismo cromosoma (Ballantyne B. 1993, Enciclopedia 1991, Morales R. 1988).

El primero en percatarse de éste fenómeno fue McClintok en 1938, y más tarde Taylor en 1958 demostró los ICHs, usando la técnica de radiografía para detectar la posición del ADN lesionado seguido de una incorporación de timidina tritiada (Ballantyne B. 1993.). Más sin embargo el análisis inequívoco del fenómeno se logró después de la incorporación de la 5-bromodesoxiuridina (5-Brdu) que ha reemplazado a la timina tritiada y varios pasos se han agregado al método para demostrar la incorporación diferencial de la 5-Brdu entre cromátidas hermanas siendo estos, la tinción con el Hoechst 33258 (colorante fluorescente), la exposición a luz negra y la tinción con Giemsa para poder ser analizados con el microscopio de campo claro (Ballantyne B. 1993, Morales R. 1988, Perry P. 1974).

El significado biológico y el mecanismo por el cual se producen los ICHs aún no se conoce, pero algunas líneas de evidencia indican que:

- a) Esos eventos ocurren durante la síntesis de ADN,
- b) estos son producidos ya sea por daño o por inhibición de la síntesis del ADN,
- c) las lesiones involucradas en la inducción de ICH no son conocidas,
- d) las lesiones de los ICHs persisten por más de una división celular y son capaces de inducir ICHs en el mismo locus en divisiones celulares sucesivas (Morales R. 1990, Morales R. 1992).

La prueba de ICHs permite detectar la capacidad genotóxica de diversas sustancias (Latt S. 1981), y es particularmente sensitiva para agentes alquilantes y análogos de bases (Encyclopedia of Human Biology 1991). Los ICHs son un método de mayor sensibilidad para la

detección de muchos mutágenos químicos en comparación con las aberraciones cromosómicas. Latt (1974) considera que esta sensibilidad de la prueba de ICH es aproximadamente 100 veces mayor que la prueba estándar de aberraciones cromosómicas (Latt S. 1974).

Para los ensayos de ICHs se han utilizado tanto sistemas *in vivo* como *in vitro*. Los primeros tienen ciertas ventajas, ya que simulan más claramente el efecto de los agentes genotóxicos y permiten que estos sean activados o inactivados metabólicamente, incluso en el caso de estudios farmacológicos es posible hacer equivalencias de dosis por peso. Los sistemas *in vitro* por lo regular tienen valores basales mayores de ICH, por lo que el efecto de dosis bajas o de agentes ligeramente genotóxicos puede quedar enmascarado (Morales R. 1988).

Así mismo se han descrito muchas variedades de sistemas *in vivo* para la prueba de ICHs, como embriones de pollo, espermatogonias de ratón, médula ósea de hamster chino, médula ósea de ratón y glándula salival de ratón entre otros. Sin embargo desde el punto de vista práctico, el sistema de médula ósea de ratón es el más simple y rápido debido a que la preparación de las figuras metafásicas es menos elaborada y el ciclo celular además de ser bien conocido es más corto en relación a otros (Perry P. 1974, Sanderbg 1984).

Centrómero



Cromátidas  
hermanas  
sin ICH



ICH sencillo



ICH doble



ICH Triple

Figura 18. Representación de los intercambios de cromátidas hermanas Sencillos, dobles y triples en cromosomas de ratón (Morales R. 1988).

## 6.2.- PRUEBA DE MICRONUCLEOS

Los micronúcleos (MN) son corpúsculos intracitoplasmáticos de cromatina separados del núcleo principal (Rigger M. 1991). El primero en encontrar un MN fue Howell en 1891 en eritrocitos, y después fue descrito por Jolly. De aquí surge el nombre de cuerpos de Howell-Jolly (como se les conoce en hematología), que se encuentran frecuentemente en la sangre periférica y que se relacionan con varios padecimientos sanguíneos (Henry J. 1993, Sanderbeg 1984).

Sin embargo fue hasta 1959 que Evans y colaboradores realizan el primer intento por utilizar a los MN para monitorear el daño citogenético inducido por los rayos gamma y los neutrones, en la presencia y ausencia de oxígeno. A principio de 1970 Schmid y colaboradores llegaron a la conclusión de que la incidencia de eritrocitos policromáticos (EPC) micronucleados era un indicador útil en el daño citogenético en médula ósea (Sanderbg 1984). En base a este trabajo fue posible desarrollar una prueba simple *in vivo*, en donde la identificación de EPC micronucleados nos permite evaluar el daño citogenético, la cual es ampliamente usada y referida comúnmente como Prueba de Micronúcleos (Scmid G. 1988).

Las evidencias sugieren que los micronúcleos se forman a partir de la ruptura de fragmentos cromosómicos acentricos, o bien por aquellos cromosomas que sufren rezago anafásico, lo cual se traduce en la aparición de un micronúcleo en células anucleadas como los eritrocitos, o bien en el citoplasma de células nucleadas como linfocitos o espermatogonias (Rigger M. 1991).

### Prueba de micronúcleos en sangre periférica.

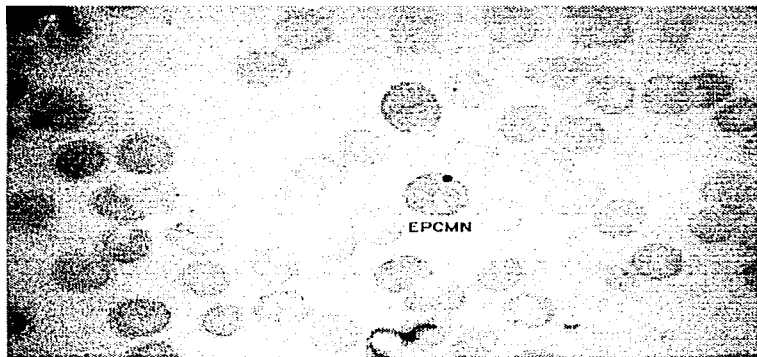
Los eritrocitos constituyen la manera más eficaz de evaluar en ellas la afección de la actividad medular, así como la capacidad clastogénica de los compuestos en corto tiempo (Mac Gregor J. 1990).

En un estudio agudo se monitorea la presencia de MN en eritrocitos policromáticos (EPC) se debe a que éstas células juvenes (reticulocitos) son producidos y liberados durante el tiempo de

estudio y constituyen la manera más eficaz de evaluar la afección de la actividad medular, así como la capacidad clastogénica de los compuestos en corto tiempo.

Los EPC presentan una coloración mezclada de basofilia y eosinofilia por lo que presentan un tinte azulado violáceo, son un poco más grandes que los eritrocitos normocromicos (ENC) y proceden de normoblastos que pierden su núcleo antes de que la hemoglobinización del protoplasma sea completa, generalmente un aumento en su número con respecto a los valores normales indica una eritropoyesis aumentada. La coloración azulada que presentan los EPC es por la presencia de ácido ribonucleico, en el momento de su diapedesis hacia la circulación, falta aproximadamente 20% del contenido final de hemoglobina por lo que aún conservan parte del aparato ribosómico para terminar la síntesis y constituir de esta manera una célula madura (Henry J. 1993).





**Figura 19. Fotografía de Eritrocito Policromático micronucleado (EPCMN) y Eritrocitos (ENC) en sangre periférica de ratón.**

OBJETIVOS

## **7.-OBJETIVOS**

### **7.1.- OBJETIVO GENERAL:**

Evaluar el efecto antigenotóxico del ácido nordihidroguayarético (ANDG) contra el mutágeno metilmetano sulfonato (MMS).

### **7.2.- OBJETIVOS PARTICULARES:**

- Determinar si existe efecto inhibitorio de los intercambios de cromátidas hermanas por el ANDG en células de médula ósea de ratones tratados con MMS.
- Realizar el estudio de la proliferación celular de los ratones administrados con los diferentes tratamientos.
- Determinar el índice mitótico en las células de médula ósea de los ratones en estudio.
- Determinar si existe una disminución en la frecuencia de micronúcleos inducidos por el MMS en ratones tratados con el ANDG.
- Evaluar los efectos del ANDG y del MMS sobre la relación de eritrocitos policromáticos/ eritrocitos normocromáticos de sangre periférica de los animales.

*HYPOTHESIS*

## 8. HIPOTESIS

Si el ácido nordihidroguayarético posee capacidad antígeno-tóxica, entonces será capaz de reducir la frecuencia de micronúcleos e intercambio de cromátidas hermanas producidas por el metil-metano-sulfonato.



MATERIAL  
Y  
METODOS

## 9.- MATERIAL Y METODOS

### 9.1.- MATERIAL BIOLÓGICO

Todos los ratones cepa NIH utilizados en los diferentes ensayos fueron machos jóvenes procedentes del Instituto Nacional de Higiene S.S y se mantuvieron bajo las mismas condiciones de luz y temperatura, con alimento y agua *ad libitum* antes y durante el experimento.

### 9.2.- REACTIVOS

Acido Nordihidroguayarético.SIGMA

Metil-metano-sulfonato.SIGMA

Dimetil-sulfoxido(DMSO).SIGMA

Colchicina.SIGMA

Solución de KCl 0.075M.

Solución de citratos-fosfatos (2xSSC)

Colorante bisbenzimidaz de Hoescht 33258.

5-Bromodesoxiuridina (5-BrdU).

Metanol.

Acido acético Glacial.

Giemsa.SIGMA

### 9.3- SOLUCIONES ADMINISTRADAS

Solución de MMS, preparada con agua destilada a una dosis de 40 mg/Kg.

Soluciones del ANDG, se prepararon con agua destilada y un 24% de DMSO (para su disolución completa..

### 9.4.- ENSAYO DE ICH.

#### 9.4.1 Determinación de la dosis letal cincuenta (DL<sub>50</sub>) del MMS.

Para poder establecer la dosis de trabajo, se determinó la DL<sub>50</sub> del metil-metano-sulfonato siguiendo el método de Lorke(Lorke D: 1983). Los animales que tenían un peso promedio de 27.65g se distribuyeron en tres lotes de 3 ratones cada uno a los que se les administró por vía intraperitoneal las dosis de 10, 100 y 1000 mg/Kg; se registran los muertos dentro de 24 hrs. y los resultados de éste ensayo sirvieron como base para seleccionar la dosis de 140, 225,370 y 600 mg/Kg se utilizó un animal por dosis; para obtener la DL<sub>50</sub> del compuesto se realiza la media geométrica entre las dosis en donde sobrevive y en la que muere el ratón.



#### 9.4.2.- Tratamiento

Se distribuyeron los ratones en 8 lotes de 5 animales cada uno y se les administró subcutáneamente en el costado, una tableta de 5-BrdU.

A los lotes se les asignó el siguiente tratamiento:

No de lote	Tratamiento
1 testigo negativo	Solución DMSO-agua (24% v/v)
2 testigo ANDG D1	1 mg/Kg de ANDG
3 testigo ANDG D2	6 mg/Kg de ANDG
4 testigo ANDG D3	11mg/Kg de ANDG
5 testigo positivo	40 mg/Kg de MMS
6 tratamiento ANDG D1	1 mg/kg de ANDG + 40 mg/Kg de MMS.
7 tratamiento ANDG D2	6 mg/Kg de ANDG + 40 mg/Kg de MMS
8 tratamiento ANDG D3	11 mg/kg de ANDG + 40 mg/Kg de MMS

Después de 30 minutos de haber implantado las tabletas, se procedió a inocular por vía intraperitoneal las tres dosis del ANDG ( D1, D2 y D3) tanto a los lotes testigos del ácido (lotes 2,3,4), como a los 3 lotes tratados con éste (tratamientos 6,7 y 8). Al mismo tiempo se administró MMS como testigo positivo (tratamiento 5).

Una hora después de haber implantado la tableta, se aplicó intraperitoneal el MMS a los lotes tratados con ANDG (lotes 6,7,8); así mismo al lote negativo se le suministró DMSO (lote1).

Transcurridas 21 hrs de haber iniciado el experimento a todos los ratones se les administró 5 µg/g de peso de colchicina por vía intraperitoneal; tres horas después se procedió al sacrificio por dislocación cervical, extrayendo la médula ósea femoral, con la ayuda de 1 ml de KCl 0.075M a 37°C, haciéndolo pasar a través del hueso al que se le han cortado previamente las epifisis, el contenido

medular se recibió en tubos de centrifuga con 7 ml de KCl sumergidos en un baño maría a 37°C, transcurridos 40 minutos se dió por terminada la incubación.

Posteriormente se fijó tres veces el paquete celular con una solución de metanol-ácido acético proporción 3:1.

Con la suspensión celular obtenida se realizaron las laminillas correspondientes a cada uno de los ratones, goteando la suspensión celular en un portaobjetos humedecido en metanol al 50% y flameando la laminilla unos segundos. Se les dejó madurar de 1 a 2 días y se procedió a realizar la tinción diferencial.

#### 9.4.3.- Tinción diferencial.

Se sumergieron las laminillas en la bisbenzimidá de Hoescht (33258) a una concentración de 100µg/ml de agua destilada y se secaron al horno a 60°C durante 15 minutos.

Ya secas se montaron las laminillas en una solución buffer de fosfatos-citratos, pH=7 con un cubreobjetos, para exponerse durante 40 minutos a luz negra (luz ultravioleta longitud de onda cercana a 10<sup>-7</sup>cm).

Enseguida se enjuagaron con agua destilada y se volvieron a secar al horno a 60°C durante 15 minutos.

A continuación se incubaron en una solución saturada de citratos (2xSSC) durante 15 minutos y se tñieron con Giemsa 4% con una solución reguladora de fosfatos con un pH de 6.8 por 7 minutos.

#### 9.4.4.- Observación al microscopio.

Cuenta de Intercambio de Cromátidas Hermanas (ICH).

Con el objetivo de 40X se localizaron las metafases que se encontraron en segunda división y se procedió a contar los intercambios entre cromátidas hermanas con el objetivo de Inmersión (100X), esto se realizó en un total de 25 metafases para cada uno de los ratones de los diferentes tratamientos.

Índice Mitótico (IM).

Se obtiene al contar el número de células que se encuentran en etapa de metafase, contenidas en un total de 1000 células por cada ratón.

Cinética de Proliferación Celular (CPK).

Se realiza contando el número de metafases en primera, segunda y tercera división celular, contenida en 100 metafases por cada ratón.

#### 9.4.5.- Análisis estadístico.

ICH e IM.- Análisis de varianza de dos factores  $\alpha=0.05$ , y para la comparación de medias se realizó la prueba t student  $\alpha=0.05$ .

La cinética de proliferación celular fue evaluada con la prueba de Ji cuadrada  $=0.05$ .

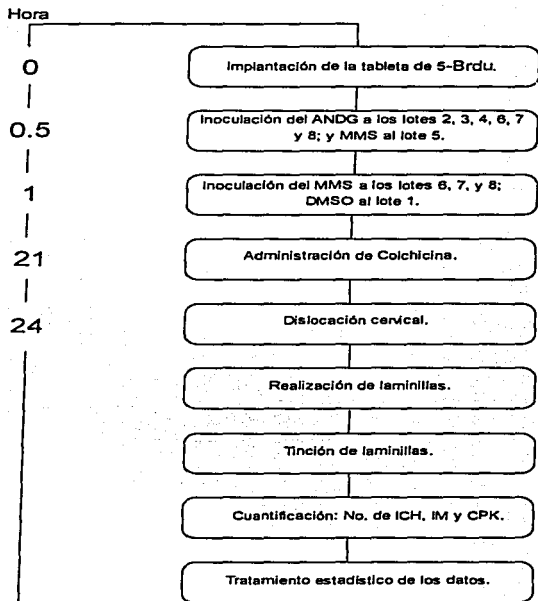


Figura 20. Diagrama de flujo del procedimiento de ICH's.

## **9.5.- ENSAYO DE MICRONUCLEOS**

### **9.5.1.- Determinación del tiempo de máxima inducción de eritrocitos policromáticos micronucleados (EPCMN) por el MMS.**

Se utilizaron 5 ratones a los que se les tomó muestra de sangre periférica obtenida por un corte de la porción terminal de la cola del ratón, depositando una gota de sangre en un portaobjetos previamente desengrasado y limpio, realizando la extensión de la gota con la ayuda de otro portaobjetos colocado en un ángulo de 45 grados del primero, a éstas laminillas se les designó como tiempo cero (T0).

Una vez realizadas las laminillas T0, se les administró por vía intraperitoneal 40 mg/Kg de MMS, tomando muestras sanguínea de la manera indicada anteriormente a las 24, 48, 72 y 96 horas.

Los frotis sanguíneos obtenidos en los diferentes tiempos se fijaron en metanol absoluto sumergiendo cada una de las laminillas por tres minutos.

Ya fijadas las laminillas se realizó la tinción empleando colorante Giemsa en buffer pH de 6.8, durante 15 minutos.

### **9.5.2.- Observación al microscopio.**

Se cuantificarón en 1000 eritrocitos policromáticos que presentan una coloración azulada, cuantos presentan micronúcleos, los cuales se distinguen como corpúsculos circulares bien definidos con coloración púrpura.

### 9.5.3.- Tratamiento anticlastogénico

Se formaron 7 lotes de 5 ratones cada uno y se les asignó el siguiente tratamiento:

No., de lote	Tratamiento
1 testigo negativo	solución DMSO-agua 24% v/v
2 testigo ANDG D <sub>1</sub>	8 mg/Kg de ANDG
3 testigo ANDG D <sub>2</sub>	11mg/Kg de ANDG
4 testigo ANDG D <sub>3</sub>	17mg/kg de ANDG
5 tratamiento ANDG D <sub>1</sub>	8 mg/Kg de ANDG + 40 mg/Kg de MMS.
6 tratamiento ANDG D <sub>2</sub>	11mg/kg de ANDG + 40 mg/Kg de MMS.
7 tratamiento ANDG D <sub>3</sub>	17mg/Kg de ANDG + 40 mg/Kg de MMS.

Se formaron todos los lotes muestras, en la forma anteriormente indicada y se les etiquetó con el número de lote y ratón a cada laminilla y se designaron T0.

Después se administró el ANDG a las diferentes dosis (D<sub>1</sub>, D<sub>2</sub>, y D<sub>3</sub>) a los lotes testigos (2,3,4) y a los lotes tratamientos (5,6,7) por vía intraperitoneal, así mismo al lote testigo se le inoculó la solución DMSO-agua.

A los 30 minutos se les administró el MMS a una dosis de 40 mg/Kg a los lotes 5,6 y 7.La siguiente toma sanguínea se realizó a las 48 hrs después de la inoculación de los tratamientos.Las laminillas obtenidas se fijaron y tiñeron de igual manera que las de la determinación del tiempo máximo de inducción de EPCMN por el MMS.

#### 9.5.4.- Observación al microscopio.

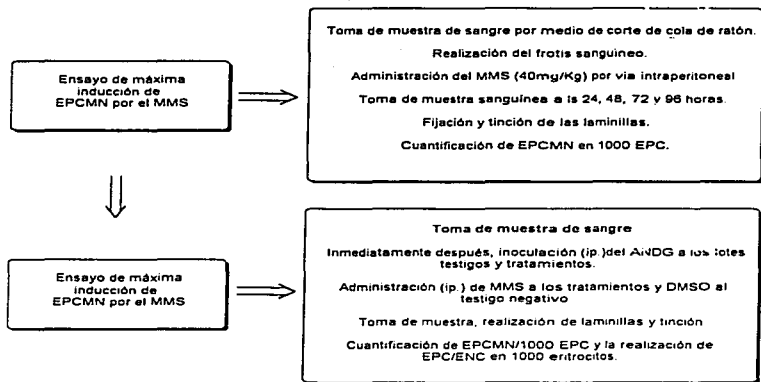
Se cuantificaron en 1000 eritrocitos policromáticos que son de una coloración azulada, cuantos presentan micronucleos, los cuales se distinguen como corpúsculos circulares bien definidos con coloración púrpura.

Se realizó el conteo de 1000 eritrocitos con el fin de obtener la relación entre eritrocitos normocromicos (ENC) los cuales presentan una coloración rosa y los eritrocitos policromáticos (EPC).

#### 9.5.5.- Análisis estadístico.

La significancia estadística en la evaluación de MN se realizó con las tablas de Kastenbaum-Bowman (1970)  $\alpha = 0.05$ .

La diferencia de medias de la realización de EPC/ENC se comparó por medio de la prueba t de student.  $\alpha = 0.05$ .



**Fig 21.- Diagrama de flujo del procedimiento de la prueba de micronúcleos.**



*RESULTADOS*

## 10.- RESULTADOS

### 10.1.- ENSAYO DE ICHS

La  $DL_{50}$  obtenida fue de 177.48 mg/kg; la dosis empleada en el estudio fue de 40 mg/kg que corresponde a una dosis máxima de casi  $\frac{1}{4}$  de la  $DL_{50}$  del mutágeno, que produjo un incremento neto de 3.86 de los intercambios de los ICHS, que equivale a un 278% de aumento en comparación con un testigo negativo y dando diferencia estadísticamente significativa (prueba t de student  $\alpha = 0.05$ ).

Las dosis empleadas del ANDG se tomaron con base en los datos reportados en el estudio genotóxico realizado en médula ósea en ratones macho (cepa NIH), utilizando como referencia la dosis de 8.8 mg/Kg que no presenta incremento significativo de los ICHS con respecto a su vehículo (Moluna J. 1996), en nuestro ensayo empleamos dos dosis por abajo de esta (1.6 mg/Kg) y una por arriba (11mg/Kg).

Los resultados de los ICHS inducidos por el ANDG, se muestran en la tabla 5 y la figura 22, en ella se puede observar que a partir de la dosis más baja (1mg/kg) hay un leve incremento de los ICHS, de un valor promedio de  $2.168 \pm 0.043$  del testigo negativo a  $2.392 \pm 0.383$  de la primera dosis del ANDG, más no presentan diferencias estadísticamente significativas con ninguna de las dosis empleadas.

El testigo positivo logra incrementar significativamente los ICHS de un valor promedio de 2.168 del testigo negativo a 6,032 que corresponde a la dosis de 40 mg/Kg del MMS.

En cuanto a los tratamientos se puede observar que desde la dosis más baja (1mg/kg) hay un decremento de los ICHS inducidos por el MMS; sin embargo es la dosis de 11 mg/Kg la que presenta diferencia estadísticamente significativa con respecto al testigo positivo, produce un decremento neto de 3.34 ICHS.

La cinética de proliferación celular es un parámetro que se utiliza para evaluar el comportamiento de las poblaciones celulares que están en división; la cual se realiza en intervalos de tiempos conocidos en condiciones normales, cuando éstas condiciones se alteran por acción de

mutágenos, puede provocar modificaciones en la cinética celular, retrasando principalmente la velocidad de la división celular, lo cual se manifiesta en una acumulación de células en alguna división celular en relación a los valores normales.

Los resultados de esta evaluación, con los diferentes tratamientos se muestran en la tabla 6 y la figura 23 e indican que no hay variación estadísticamente significativa en ninguno de los tratamientos realizados en este estudio. El tiempo promedio de generación (TPG) es un índice que relaciona metafases de primera (M1a), segunda (M2a) y tercera (M3a) división y se expresa de la siguiente manera:

$$TPG = 21 / (1) (M1a) + (2) (M2a) + (3) (M3a)$$

EL TPG presentó valores desde 10:03 a 10:48 hrs, por lo que se puede observar éstos valores son muy cercanos, y no presentan diferencia estadísticamente significativa.

El índice mitótico (IM) es indicativo de la capacidad de división celular, en la cual una célula madre origina a dos células hijas, las fases del ciclo celular se pueden alterar ante la presencia de agentes citotóxicos que pueden disminuir el IM a causa de la muerte celular. En cuanto a este parámetro se observa que los valores en los diferentes tratamientos no presentan diferencia estadísticamente significativa con respecto al testigo negativo como se muestra en la tabla 7 y la figura 24.

**Tabla 5.- Frecuencia de intercambio de cromátidas hermanas en médula ósea de ratones tratados con ANDG, MMS y la combinación de ambos agentes.**

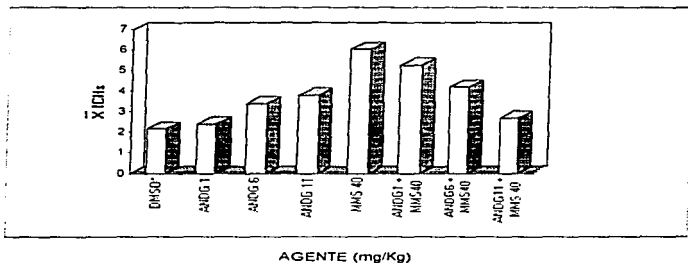
Agente	Dosis (mg/Kg)	x ICH ± d.e.
DMSO	*	2.2 ± 0.04
ANDG	1	2.4 ± 0.38
ANDG	8	3.4 ± 0.38
ANDG	11	3.8 ± 0.18
MMS	40	6.0 <sup>†</sup> ± 0.34
ANDG + MMS	1 + 40	5.3 <sup>†</sup> ± 0.21
ANDG + MMS	6 + 40	4.2 ± 0.34
ANDG + MMS	11 + 40	2.6 <sup>‡</sup> ± 0.27

\* DMSO-agua (24% v/v)

† Diferencia estadísticamente significativa con respecto al control negativo (DMSO); t-student  $\alpha = 0.05$ .

‡ Diferencia estadísticamente significativa con respecto al testigo positivo (MMS); t-student  $\alpha = 0.05$ .

d.e. desviación estandar.



**Figura 22. Frecuencia de intercambio de cromátidas hermanas en ratones con ANDG, MMS y la combinación de ambos agentes. \*DMSO-agua (24%).**

**Tabla 6.- Cinética de proliferación celular y tiempo promedio de generación (TPG) en ratones administrados con ANDG, MMS y la combinación de ambos compuestos.**

Agente	Dosis (mg/Kg)	M1a	M2a	M3a	TPG $\pm$ d.e
DMSO	*	27.4	43.4	29.2	10:41 $\pm$ 0.02
ANDG	1	25.2	38.4	36.4	10:34 $\pm$ 0.24
ANDG	6	20.4	46.4	33.2	10:27 $\pm$ 0.25
ANDG	11	23.8	43	33.2	10:03 $\pm$ 0.16
MMS	40	26	47.8	27.8	10:04 $\pm$ 0.97
ANDG + MMS	1 + 40	27.4	44.8	27.8	10:48 $\pm$ 0.26
ANDG + MMS	6 + 40	22.6	52.8	24.6	10:40 $\pm$ 0.20
ANDG + MMS	11 + 40	27.4	37.2	35.4	10:10 $\pm$ 0.24

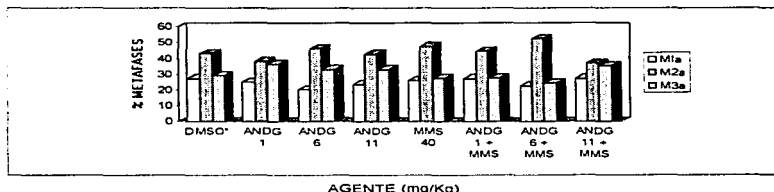
\* DMSO-agua (24% v/v)

d.e desviación estándar.

M1a: metafases de la división.

M2a: metafases de 2a división

M3a: metafases de 3a división



**Figura 23. Cinética de proliferación celular en medula ósea de ratones tratados con ANDG, MMS y la combinación de ambos agentes. \*DMSO-agua (24% v/v).**

Tabla 7.- Índice mitótico (IM) en médula ósea de ratones tratados con ANDG, MMS y la combinación de ambos.

Agente	Dosis (mg/Kg)	IM $\pm$ d.e.
DMSO	*	42.2 $\pm$ 3.56
ANDG	1	48.2 $\pm$ 1.92
ANDG	6	47.2 $\pm$ 3.43
ANDG	11	41.8 $\pm$ 2.49
MMS	40	48.2 $\pm$ 2.16
ANDG + MMS	1 + 40	53.2 $\pm$ 3.03
ANDG + MMS	6 + 40	43 $\pm$ 2.91
ANDG + MMS	11 + 40	41.8 $\pm$ 2.58

\* DMSO-Agua (24% v/v)

d.e. desviación estándar.

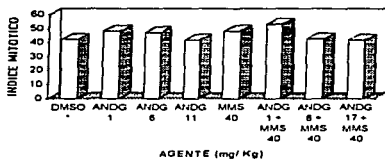


Figura 24. Índice mitótico en ratones tratados con ANDG, MMS y la combinación de ambos agentes. \*DMSO-agua (24% v/v).

## 10.2.- ENSAYO DE MICRONUCLEOS.

Como parte inicial del ensayo de micronúcleos (MN) se determinó el tiempo de máxima inducción de EPCMN de sangre periférica de ratón macho (cepa NIH); como se puede observar en la figura 25; el tiempo de máxima inducción se presentó a las 48 hrs de haber administrado al MMS siendo el valor promedio de 13.2 EPCMN el cual es estadísticamente significativo con respecto al tiempo cero que fue de 2.8 EPCMN (tablas de Kastenbaum-Bowman  $\alpha=0.05$ ).

Las dosis empleadas en este ensayo se tomaron con base en los resultados del estudio genotóxico del ácido nordihidroguayarárico en donde la dosis de 8.8 mg/Kg no presenta efecto genotóxico ni citotóxico (Molina J. 1996), por lo que se toma una dosis por abajo de esta (6mg/Kg) y dos por arriba (11 y 17 mg/Kg).

En la tabla 8 se muestran los resultados de la frecuencia de EPCMN de ratón antes (T0) y después (T48) de la administración de ANDG, MMS y la combinación de ambos agentes. La frecuencia basal de MN (T0), es homogénea de 2.0 EPCMN a 2.8 EPCMN, sin presentarse diferencia estadísticamente significativa entre los grupos. El ANDG no incrementa la frecuencia de EPCMN (T48) en ninguna de las dosis administradas, en cuanto a los tratamientos desde la primera dosis de ANDG (6 mg/Kg) se produce una reducción de EPCMN, sin embargo esta no es estadísticamente significativa, tanto la dosis de 11mg/Kg como la de 17mg/Kg disminuyen significativamente los MN, producen un decremento neto de 7.2 EPCMN y 7.8 EPCMN respectivamente.

En lo referente a la relación EPC/ENC la tabla 9 muestra los resultados tanto del T0 como el T48 de cada uno de los tratamientos. En el T0 la tasa basal de la relación se sitúa entre 0.037 a 0.056, en tanto que después del tratamiento, a relación del EPC/ENC disminuye con las tres dosis administradas del ANDG (6,11 y 17 mg/Kg) de 0.045 de la frecuencia del testigo negativo a 0.0438, 0.0369 y 0.033 siendo estas diferencias estadísticamente significativas con respecto al testigo negativo (prueba t-student  $\alpha=0.05$ ).

Sin embargo el valor mínimo obtenido de la relación de EPC/ENC es de 0.12 que corresponde al MMS en tanto los tratamientos sólo las dos primeras dosis del ANDG (6 y 11 mg/Kg) muestran diferencia estadísticamente significativa, ya que aún se observa un decremento en relación al testigo negativo, pero con la dosis de 17 mg/Kg de ANDG ya no se observa diferencia significativa con respecto al testigo negativo.

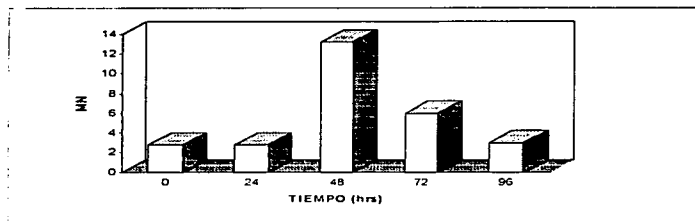


Figura 25. Tiempo de máxima inducción de micronucleos en EPC de sangre periférica de ratón, por el Metil-Metano-Sulfonato.

\*Diferencia estadísticamente significativa con respecto al tiempo 0.  
Tablas de KASTEMBAUM-BOWMAN  $\alpha = 0.05$ .



Tabla 8.- Frecuencia de EPCMN de sangre periférica de ratón antes (T0) y después (T48) de la inoculación de ANDG, MMS y la combinación de ambos agentes.

AGENTE	Dosis (mg/Kg)	EPCMN/1000 EPC (T0)	EPCMN/1000 EPC (T48)
DMSO	*	2.4	2.2
ANDG	6	2.2	1.4
ANDG	11	2.4	0.8
ANDG	17	2.6	0.8
MMS	40	2.8	13.2 <sup>†</sup>
ANDG + MMS	6 + 40	2	10.8 <sup>†</sup>
ANDG + MMS	11 + 40	2.4	5*
ANDG + MMS	17 + 40	2.4	4.4*

\* DMSO-Agua (24% v/v).

† Diferencia estadísticamente significativa con respecto a testigo negativo. Tablas de Kastenbaum-Bowman  $\alpha=0.05$ .

◆ Diferencia estadísticamente significativa con respecto al testigo positivo. Tablas de Kastenbaum-Bowman  $\alpha=0.05$ .

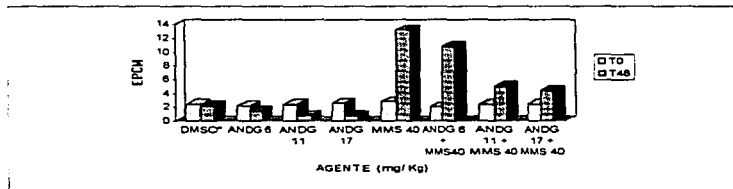


Figura 26. Frecuencia de EPCMN antes (T0) y después (T48) de administrar ANDG, MMS y la combinación de ambos agentes. \*DMSO (24% v/v).

Tabla 9.- Relación de EPC/ENC en sangre periférica de ratón antes (T0) y después (T48) de la inoculación de ANDG, MMS y la combinación de ambos agentes.

Agente	DOSIS (mg/Kg)	EPC/ENC (T0)	EPC/ENC (T48)
DMSO	*	0.045	0.045
ANDG	6	0.048	0.0438*
ANDG	11	0.045	0.0369*
ANDG	17	0.037	0.033*
MMS	40	0.05	0.012*
ANDG + MMS	6 + 40	0.056	0.045*
ANDG + MMS	11 + 40	0.055	0.0517*
ANDG + MMS	17 + 40	0.053	0.049

\* DMSO-Agua (24%v/v).

† Diferencia estadísticamente significativa con respecto a su testigo. Prueba t student  $\alpha = 0.05$ .

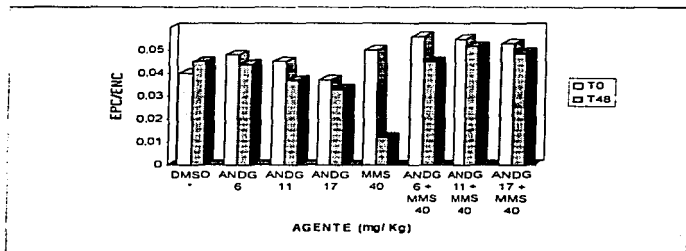


Figura 27. Relación de EPC/ENC antes (T0) y después (T48) de la administración de ANDG, MMS y la combinación de ambos agentes. \*DMSO-agua (24% v/v).

*DISCUSSION*

## 11.- DISCUSION

En el ensayo desarrollado en médula ósea de ratón ninguna de las dosis del ANDG *per se* incrementó significativamente la frecuencia de ICHs, por otro lado se encontró efecto protector desde la primera dosis de 1mg/Kg de ANDG ya que inhibió un 25.58% los ICHs producidos por el MMS; sin embargo esta disminución no fue estadísticamente significativa en relación con el testigo positivo; en cuanto a las otras dosis también producen decremento en la frecuencia de los ICHs, mostrando una relación dosis-respuesta, como lo comprueba el análisis de regresión lineal a los valores de ICHs donde se obtuvo un coeficiente de correlación de 0.98 . La dosis más efectiva fue la de 11 mg/Kg la que presenta diferencia estadísticamente significativa con respecto al testigo positivo (MMS) y logra disminuir los ICHs hasta casi el valor obtenido con el testigo negativo. Todo esto muestra que a las dosis empleadas, el ANDG presenta efecto protector y no incrementa significativamente los ICHs, es decir que el ANDG no presentó efecto genotóxico, esto es congruente con los resultados que se obtuvieron en el estudio genotóxico evaluado *in vivo* en donde a dosis bajas no se incrementa significativamente la frecuencia de ICHs (Molina J. 1996).

En nuestro estudio se utilizó el índice mitótico (IM) como parámetro para evaluar el posible efecto citotóxico del ANDG, se observó que ninguna de las dosis empleadas (1,6,11mg/Kg) disminuyó el IM con respecto al testigo negativo, tanto en los lotes testigo del ANDG como en los tratamientos. Esto indica que el compuesto no provocó daño celular, es decir que a las dosis empleadas el ANDG no es citotóxico.

El análisis de la cinética de proliferación celular, mostró que no hubo variación en la velocidad de división celular con ninguna de las dosis el ANDG, y por consiguiente el tiempo promedio de generación no se vió alterado con respecto al testigo negativo. Esto nos confirma que el ANDG no es tóxico a las dosis utilizadas en este ensayo.

En cuanto al efecto del mutágeno empleado como podemos observar en nuestros resultados el MMS a la dosis de 40 mg/Kg produce un fuerte incremento en la frecuencia de

ICHs y no produce efecto citotóxico, ya que el IM, la cinética de proliferación celular y el tiempo promedio de generación no presentaron variación con respecto al testigo negativo, esto es congruente con lo reportado en la literatura ya que es reconocido que los agentes alquilantes monofuncionales son mutágenos más eficientes y presentan menos citotoxicidad que los agentes alquilantes bifuncionales (Brookes P. 1990). Sin embargo K. S. Tao y colaboradores (1993), reportan que el MMS es un clastógeno muy potente y que podría ser considerado como un superclastógeno en igual forma que se maneja que la etilnitrosourea es un super mutágeno , ya que se maneja que el efecto más fuerte del MMS es el clastogénico es muy importante evaluar si el ANDG es capaz de proteger al genoma de éste; así que el otro ensayo utilizado fue la prueba de micronúcleos.

Como parte inicial se determinó el tiempo de máxima inducción de micronúcleos por el MMS en sangre periférica de ratón, con el fin de asegurar que el tiempo de la toma de muestra del ensayo anticlastogénico fuera la óptima. En base a la curva obtenida el tiempo de máxima inducción de EPCMN fue a las 48 horas de la administración del MMS, estos resultados coinciden con lo reportado por Mac Gregor (1990) utilizando mitomicina C y trietilenmelamina, en donde se observa que en ambos casos la máxima inducción de EPCMN en médula ósea se tiene a las 24 horas posteriores a una administración simple, pero que esta frecuencia disminuye a las 48 horas en este tejido, mientras que en este tiempo se tiene la frecuencia máxima en sangre periférica.

La tasa basal (T0) de la frecuencia de EPCMN en todos los lotes no mostró variación, ya que las medias van de un valor de 2 a 2.8 EPCMN por 1000 EPC, estos datos son congruentes con los reportados en la misma cepa por Salomone (1994) en donde establece una media de 3.95. (Salomone F. 1994).

En lo referente al ensayo anticlastogénico el ANDG en las tres dosis utilizadas (6,11 y 17 mg/Kg) no incrementa la frecuencia de EPCMN, como se puede observar en los resultados hay un leve decremento de la frecuencia de EPCMN del T0 al T48, sin embargo esto no tiene ningún significado biológico ya que las lecturas se encuentran dentro de los valores normales. Los lotes del tratamiento, mostraron desde la primera dosis (6 mg/Kg) un decremento de la

frecuencia de MN sin embargo ésta no es estadísticamente significativa, este decremento muestra una relación dosis-respuesta con las dosis empleadas del ANDG, en el coeficiente de regresión lineal obtenido del análisis de la frecuencia de EPCMN que es de 0,9; siendo las dosis más efectivas las de 11 y 17 mg/Kg que mostraron diferencia estadísticamente significativa. Esto nos indica que el ANDG se comportó como un buen anticlastógeno y que por sí mismo no produce daño citogenético.

Los resultados de la relación de eritrocitos policromáticos entre eritrocitos normocromicos (EPC/ENC) muestra que el ANDG afecta la producción eritropoyética desde la primera dosis el decremento es de 0.045 EPC/ENC del testigo negativo a 0.0438 EPC/ENC del testigo de la dosis de 8 mg/Kg de ANDG esta diferencia es estadísticamente significativa, con las otras dosis el comportamiento fue el mismo y la relación de EPC/ENC disminuyó conforme aumentó la dosis; sin embargo en los tratamientos se observó que el ANDG modula el efecto depresivo causado por el MMS, logrando con la dosis de 17 mg/Kg reestablecer la producción eritropoyética. En base a estos resultados podemos decir que el ANDG a las dosis empleadas modifica *per se* la producción eritropoyética, pero que al enfrentarlo con el MMS modula el efecto citotóxico del mutágeno.

En nuestro ensayo, como es en un sistema *in vivo*, al administrar el ANDG al ratón, este compuesto sufre biotransformación, en la cual alguno de los metabolitos pudiera ser capaz de producir el efecto citotóxico. Un estudio realizado en ratas mostró que el ANDG biotransforma en el intestino delgado en o-quinona; este metabolito se encontró en la orina, riñón y heces de los animales (Goodman T. 1970); esta o-quinona sufre reacciones de oxidoreducción generando especies reactivas como radicales libres, que reaccionan con las macromoléculas de la célula, tales como proteínas lípidos y con el ADN (Pryor W. 1994), por lo que es posible que esta o-quinona sea la responsable del efecto citotóxico observado en la producción eritropoyética.

Por los resultados obtenidos en los dos ensayos realizados al ANDG podemos observar claramente que tiene capacidad antígeno tóxica y suponemos que este antioxidante actúa como dismutágeno, es decir como un interceptor molecular frente a los grupos metilos que son

especies electrofílicas con las que el ANDG puede reaccionar directamente, esto es sugerido también por Zhi Wang y colaboradores en su estudio de antimutagenicidad en bacterias, en donde el ANDG fue retado con otros mutágenos de acción directa (Wang Z. 1991).

Nuestro ensayo es parte de un proyecto que se realizó en el laboratorio de Genética para evaluar la genotoxicidad y antigenotoxicidad del ANDG, el estudio de genotoxicidad tanto *in vivo* como *in vitro* mostró que el compuesto es inductor de ICHs y citotóxico a dosis altas, y en el presente estudio de antigenotoxicidad muestra que el ANDG a las dosis empleadas se comporta como un buen antigenotóxico. Se observa que el compuesto tiene una función dual en el organismo vivo, y la dosis administrada es uno de los factores que determinan la función.



*CONCLUSIONES*



## 12.- CONCLUSIONES

En base a los resultados obtenidos en el presente trabajo se concluye que :

- 1) El ANDG se comportó como un buen antigenotóxico a las dosis empleadas.
- 2) El comportamiento antigenotóxico se expresó en una relación dosis-respuesta.
- 3) El ANDG a las dosis empleadas no presentaron efecto citotóxico, ni alteraron el tiempo promedio de generación.
- 4) El tiempo de máxima inducción de EPCMN por el MMS ocurrió a las 48 hrs de haberto administrado.
- 5) Aún cuando el ANDG *per se* modifica la producción eritropoyética, al retarlo con el MMS el ácido logra restituir la actividad eritropoyética

ESTA TESIS NO DEBE SALIR DE LA BIBLIOTECA

*BIBLIOGRAFIA*

### **13.- BIBLIOGRAFIA**

- 1.- Agarwal, R., Wang, Z.Y., Birk, D.P. y Murkhtar, H. (1991). Nordihydroguaiaretic acid, an inhibitor of lipoxigenase, also inhibits cytochrome P-450-mediated monooxygenase activity in rat epidermal and hepatic microsomes. *Drug. Metab. Disp.* 19(3):620-624.
- 2.- Ames, B. N. (1983). Dietary carcinogenesis and anticarcinogens. *Science.* 221:1256-1264
- 3.- Ames, B. N., Shigenaga, M. K.; Hagen, T. M. (1993). Oxidants, antioxidants and the degenerative diseases of aging. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90:7915-7922
- 4.- Ballantyne, B. M., y Timothy T., P. (1993). "General & Applied Toxicology". vol 2; Stockton Press. Great Britain by the Bath Press Ltd.
- 5.- Barnsley, E. A. (1968). The Metabolism of Methyl Methanesulphonate in the rat. *Biochemical Journal.* 106:18p
- 6.- Beranek, T. D. (1990). Distribution of methyl and ethyl adducts following alkylation with monofunctional alkylating agents. *Mutat. Res.* 231: 11-30
- 7.- Brookes P. (1990). The early history of the biological alkylating agents 1918-1968. *Mutat. Res.* 233:3-14.
- 8.- Burk, D.F. (1991) "Antioxidants In: Food Additive User's Handbook"; Smith, J. (ed.). Blackie and Son Ltd ; Great Britain .

- 9.- Cairns, J. (1993) "Antimutagenesis and Anticarcinogenesis Mechanism". Plenum Press New York.
- 10.- Campos, L. E., Marby, T. J. y Fernández, T. S. (1981) "Larrea. Serie del Desierto," 2a ed. Vol 2 ; Conacyt ; México .
- 11.- Capdevila, J., Gil, L. , Orellana, M., Mamett, L. J., Mason, J. I. , Yadagiri, P. y Falck, J. R. ; (1988). Inhibitors of cytochrome P-450-dependent arachidonic acid metabolism. Arch. Biochem. Biophys. 261(2):257-263
- 12.- Cerruti, P. A. (1985). Prooxidant states and tumor promotion. Science. 227:375-381
- 13.- Chaudhry, M.A.; y Fox M. (1990). Methyl methane sulphonate y X-ray-induced mutations in the chinese hamster hprt gene: mRNA phenotyping using polymerase chain reactions. Mutagenesis. 5:497-504
- 14.- Cole, R.J., Taylor, N., Coley, J y Arlett, C.F. (1981). Short-Term Tests for Transplacentally Active Carcinogens. Mutat. Res. 80:141-157
- 15.- Cortinas de Nava, C. y Espinoza, A. J. (1990) Carcinogenesis. "En Cáncer y Ambiente Bases epidemiológicas para su investigación y control." Corey, O.,G. (Ed.); ECO/OPS; México.
- 16.- De flora, S. y Ramel, C. (1988). Mechanismos of inhibitors of mutagenesis and carcinogenesis. Mutat.Res. 202: 285-306
- 17.- Derache, R.(1990) "Toxicología y Seguridad de los Alimentos". Ed. Omega, Barcelona. España.

- 18.- Encyclopedia of Human Biology;(1991) vol 5; Academic Press Inc. , U.S.A.
- 19.- Ehling U. H. ; Neuhauser-Klaus A. (1990). Induction of specific-locus and dominant lethal mutations in male mice in the low dose range by methyl methanesulfonate (MMS). *Mutat. Res.* ; 230:61-70
- 20.- Esterbauer, H. , Eckl, P. y Otner, A. (1990). Possible mutagens derived from lipids and lipid precursors. *Mutat. Res.* 238:223-233.
- 21.- Etlne-Decant. (1988) "Genetic Biochemistry from Gene to Protein". Plenum Press. England.
- 22.- Frasier, L. , Kehrer, J.P. (1993). Effect of idomethacin, aspirin, nordihydrogualeic acid and piperonyl butoxide on cyclophosphamide-induced bladder damage. *Drug.Chem. Toxicol.* 16(2):117-133.
- 23.- Frenk S. (1996). Enfermedades relacionadas con la acción de los radicales libres. *Gac. Méd. Méx.* 132(2):205-210.
- 24.- Galloway S. M. (1994). Chromosome Aberrations, Induced In Vitro Mechanism, Delayed Expression and Intriguing Questions. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 23, suplement 24:44-53.
- 25.- Garner, E. J., Simmons, M.J. y Snustad, D. P.; "Principles of Genetic" 8th ed.; John Wiley & Sons Inc. U.S.A. (1991).
- 26.- Goldstein A. (1979). "Farmacología". Ed. Limusa. México .

- 27.- González, B. M. (1989). "Fundamentos de Oncología Médica". Ed Interamericana-Mc-Graw-Hill; España.
- 28.- Goodman, T. Grice, H. C.Becking,G. C.y Salem, F.A. (1970). A cystic nephropathy induced by nordihidroguayaretic acid in the rat. *Laboratory Investigation*. 23(1):93-107
- 29.- Goodman, A.,Goodman,S., Louis y Gilman A. (1980) "Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica". 6a ed. Ed Panamericana..
- 30.-Goodman,Y.,Steiner,M.R.;Steiner,S.M. y Mattson, M. (1994). P. Nordihidroguayaretic acid protects hippocampal neurons against amyloid  $\beta$ -peptide toxicity and attenuates free radical and calcium accumulation. *Brain Res*. 654: 171-176.
- 31.-Grice, H.C.; Becking, G., y Goodman, T(1968). Toxic properties of nordihydroguaiaretic acid .; *Food Cosmet. Toxicol*. 6:155-161.
- 32.- Henry J. (1993) "Diagnóstico y tratamiento clínico por el laboratorio"; 9a ed.; Ed. Salvat; España;.
- 33.- Hikoya, H. y Sakae, A. (1988). Dietary inhibitors of mutagenesis and carcinogenesis. *Mutat. Res*. 202: 429-446.
- 34.- Igalili, M.A.;Martí J., Thomas B., D.,Vos, M. , Moody T., Treston M.; Martínez A. y Mulshine L. (1996). Growth Control of Lung Cancer by Interruption of 5-lipoxygenasa-mediated Growth Factor Signaling. *The Journal of clinical Investigation* 97 (3): 806-813;
- 35.- Irache,J.M.;Vega, F.A. y Ezpeleta, Y. (1992). Antioxidants in some pharmaceuticals, cosmetics, and food from the european market. *Pharm. Acta. Helv*. 67: 152-155

- 36.- Kaina Bernd, Fritz, G., y Coquerelle T. (1993). Contribution of O<sup>6</sup>-Alkylguanine and N-Alkylpurines to the Formation of Chromatid Exchanges, Chromosomal Aberrations, and gene Mutations: New insights Gained From Studies of Genetically Engineered Mammalian Cell Lines. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 22:283-292
- 37.- Karger D. (1990) "Oxigen radicales Systemic Events and Disease Processes." Editoits:Dipakk Das, Walter, B. Essma; Switzerland by Thur AG offseidruck, Pratelein .
- 38.- Kastenbaum M. A. y Bowman K.O. (1970). Tables for determining the statistical significance of mutation frequencies. *Mutat. Res.* 9: 527-549.
- 39.- Koberle B. Roscheisen C., Herbig R. y Speit G. (1993). Molecular charecterization of methylmethanosulfonate (MMS)-induce HPRT mutations in V79 cells. *Mutation Research*.301:55-71.
- 40.- Kuroda, Y., Jain, A., Ki, Tezuka, H., y Kadat. (1992). Antimutagenicity in cultured mammalian cells; *Mutat. Res.*; 267:201-209.
- 41.- Lait S., A., (1974). Sister chromatid exchanges, indices of human cromosome damage and repair, Detection by fluorescence and induction by mitomycin C. *Proc. Natl Acad. Sci (U.S.A)* 71: 3162-3166.
- 42.- Lait, S., A., J. ALLEN, S. y E. Bloom, (1981). Sister Chromatid Exchanges: a report of the Gene Tox Program. *Mutation Research*. 87: 17-62.

- 43.- Lee, W. R.; Beranek, D., T. y Byrne, B., J., (1989). Dos-response relation ships for methyl methane sulphonate in *Drosophila melanogaster* spermatozoa: DNA methylation per nucleotide vs. Sex linked recessive lethal frequency. *Mutat. Res.*; 211:243-257
- 44.- Lewin, B. (1994) "Gene V". Press Inc. New York. by Oxford University. U.S.A.
- 45.- Loomis, T.A. (1985) "Fundamentos de Toxicología"; Ed. Acribia. España .
- 46.- Lorke, D. (1983). A new approach to practical acute toxicity testing; *Arch. Toxicol.* 54: 275-287
- 47.- Mac Gregor J. T., Wehr C. M. y Henika R.; P. (1990). The in vivo Eritrocyte Micronucleus Test: Mesurement at steady State Increases Assay Efficiency and permits integration with Toxicity Studies *Fundamental and Applied Toxicology* 14:513-522.
- 48.- Mac Rae, W., D., y Towers, G., H.(1984). Biological activities of lignans. *Pytochemistry* 23(6):1207-1220.
- 49.- Martin, W.D., Rodwell, W. V. y Mayes A. P. (1986) "Bioquímica de Harper". 10a ed.; Ed. El Manual Moderno. México.
- 50.- Martínez, M. (1989) "Las plantas Medicinales de México", 6a de. Ed. Botas México.
- 51.- Mc Cormick, D.L. y Spicer, A., M. (1987). Nordihidroguaretic acid suppression of rat mammary carcinogenesis induced by N-methyl- N-nitrosourea. *Cancer Lett.* 37:139-146.
- 52.- Miller J. H. (1992) "A Short Course in bacterial Genetics A Laboratory Manual and Handbook for *Escherichia coli* and related Bacteria". Cold Spring Harbor Laboratory Press. U.S.A.



- 53.- Mittal, A., y Mussarrat, J.. (1990). Effect of methyl methane sulphonate on the secondary structure of DNA. *Med. Sci. Res.* 18: 633-635.
- 54.- Molina J. D.; Estudio de la capacidad genotóxica del ácido nordihidroguaiarético (ANDG) en médula ósea de ratón. Tesis de Maestría en la Especialidad de Toxicología, ENCB-IPN, México (1996).
- 55.- Morales R..P. (1988). El daño a la información genética y los intercambios de cromátidas hermanas. *Ciencia y Desarrollo* 14(XIV):65-72.
- 56.-Morales, R., P; Rodríguez R. y Vallarino Kelly. (1990). Fate of DNA lesions that elicit sister-chromatid exchanges. *Mutation Research.* 232:77-88.
- 57.- Morales, R., P., y Rodríguez-R. R. (1992). Vallarino Kelly, T. In Vivo fate of MMS-induced DNA lesions that elicit SCE. *Mutation Research.*272: 215-221.
- 58.- Nakadate, T., Yamamoto, S. y Iseki, H. (1982). Inhibition of 12-o-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate-induced tumor promotion by nordihydroguaiaretic acid, a lipoxigenase inhibitor, and p-bromophenacylbromide, a phospholipase A<sub>2</sub> inhibitor. *Gann.* 73: 841-843.
- 59.- Nakayama, T, Niimi, T, Osawa, T., y Kawakishi, S. (1992). The protective role of polyphenols in cytotoxicity of hydrogen peroxide. *Mutat. Res.* 281:77-80.
- 60.- Norihiro N, Yuji, I, Masaru H, y Minoru W. (1996). Openin of Ca - Dependent K Channels by Nordihydroguaiaretic acid in Porcine Coronary Arterial Smooth Muscle Cells. *Jpn. J. Pharmacology.* 70:281-284.

- 61.- Ohta T.. (1993). Modification of Genotoxicity by Naturally Occurring Flavoring and their Derivatives. *Critical Reviews in Toxicology*, 23(2): 127-146
- 62.- Oliveto, E., P. (1972). Nordihydroguaiaric acid, A naturally occurring antioxidant. *Chem. Ind.* 2: 677-679.
- 63.- Orrenius S. (1993) Mechanisms of oxidative cell damage In: "Free radicals from basic science to medicine molecular and cell biology updates"; Azil Angelo; Lester Racker (eds.); Germany
- 64.- Perry, P.; Wolff, S. (1974). New Giemsa method for the differential staining of sister chromatids. *Nature*, 251: 156-158.
- 65.- Piña G. E. y Humberman A. (1990). Los radicales libres Beneficios y Problemas; *Gac. Med. Mex* 132(2): 183-195.
- 66.- Ponce A. G. ; Estudio genotóxico del ácido nordihidroguaiarético sobre cultivos de linfocitos humanos. Tesis Profesional Química Farmacéutica Bióloga; FES-Cuautitlán, UNAM, México (1995).
- 67.- Pryor W. A. (1994) Oxidants and Antioxidants In: "Natural Antioxidants in human health and disease." B. Frei (eds.). Academic Press, U.S.A .
- 68.- Ramel, C., Alekperov, U.V., Ames, B., N., Kada, T. y Wattenberg, L. (1988). Inhibitors of mutagenesis and their relevance to carcinogenesis. *Mutation Research*. 168:47-65

- 69.- Reddy N., R., Pierson M., B. y Lechowich R., V. (1982). Inhibition of Clostridium botulinum by Antioxidants, Phenols, and Related Compounds. Applied and Environmental Microbiology, 43(4):835-839.
- 70.- Rigger M., G. (1991) "Glosary of genetics Classical and Molecular"; 5a de.; Springer Verlag, Alemania 339-345 .
- 71.- Robison, T., W., Sevanian, A. Jay Forman, H. (1990). Inhibition of arachidonic acid release by Nordihydroguaiaretic acid and its antioxidant action in rat alveolar macrophages and chinese hamster lung fibroblasts. Toxicol. Appl. Pharmacol., 105:113-122.
- 72.- Rodriguez A. R., Orozaco S., Gaytan O., J. y Graf, U. (1996). Analysis of mitotic recombination induced by several mono- and bifuncional alkylating agents in the Drosophila wing-spot-test. Mutat. Res. 351:133-145.
- 73.- Salamanca F. (1990) "Citogenética Humana." Ed. Médica Panamericana. México.
- 74.-Salomone F. M. y Mavournin K. H. (1994). Bone Marrow Micronucleus Assay: Review of the Mouse Stocks Used and Their Published Mean Spontaneous Micronucleus Frequencies. Environmental and Molecular Mutagenesis 23:239-273.
- 75.- Sanderbg,(1984) "Sister Chromatid Exchanges." Plenum Publishing Corporation; New York.
- 76.- Schmid,G. (1986) "Química biológica". Ed. Interamericana España.
- 77.- Sherwin, E. R. (1990) Antioxidants In: "Food Additives;"Branen, A., L., Davidson, P., M., Salminen. S.; (eds). Marcel Dekker Inc., New York.

- 78.- Smith, W. (1990) "Molecular and cell biochemistry Molecular Biology and Biotechnology". Smith and Chapman & Hall ; Hong Kong.
- 79.- Stanley E. M. (1988) "Toxicology Chemistry", Lewis Publisher Inc., USA .
- 80.- Silies T. (1993) "Inmunología Básica y Clínica; 7a ed.; Ed.; El Manual Moderno; México .
- 81.- Takasashi K., Yutaka K., Kunihiro S., Yasaku N. y Mutsuo S. (1988). Activation of Ada Protein as a Transcriptional regulator by Direct Alkylation with Methylating Agents. The Journal of Biological Chemistry. 263(27):1340-13492.
- 82.- Tao K., S., Urlando C., y Heddie A., J. (1993). Mutagenicity of Methyl Methanesulphonate (MMS) In Vivo at the Dlb-1 Native locus and lacI Transgene. Environmental and Molecular Mutagenesis 22:293-296.
- 83.- The Merck Index ; 11th edition; Merck And Co. Inc. Rahway; New Jersey U.S.A.; (1989).
- 84.- Vogel W., E. y Nivard J., M. (1994). The subtlety of alkylating agents in reactions with biological macromolecules. Mutation Research. 305:13-32.
- 85.- Wang,Z.; Argarwal,R.; Zhou,Z. y Murkhtar,H. (1991) Antimutagenic and antitumorogenic activities of nordihidroguaiaretic acid. Mutation Research, 261: 153-162.
- 86.- Waters D., M., Frank, S. Jackson, A.M.; Brockman E.M. y De Flora S. (1996). Activity profiles of antimutagens: in vitro and in vivo data. Mutation Research; 350:102-129.
- 87.- Watson, H. y ,Robert, S. W.. (1987) "Molecular Biology of the Gene". The Benjamin/Cumming Publishing Company. Inc 4a de. U.S.A.

88.- Williams, K., Cummings R. (1991) "Concepts of Genetics". 3a ed. Ed. Macmillan Publishing Company U.S.A.

89.- Wingrove S.A. y Caret L. R. (1986). "Química Orgánica. Ed. Harla. México.