



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
CUAUTITLÁN

ESTUDIO DE LA CAPACIDAD ANTIGENOTÓXICA DEL  
GORDOLOBO (*Gnaphalium oxyphyllum*) EVALUADA POR LA  
FRECUENCIA DE INTERCAMBIO DE CROMÁTIDAS  
HERMANAS *IN VIVO*

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

**QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

P R E S E N T A :

MARCO ANTONIO LUNA MENDOZA

ASESORA: M. en C. SANDRA DÍAZ-BARRIGA ARCEO

CO-ASESOR: DR. EDUARDO MADRIGAL BUJADAR

CUAUTITLÁN IZCALLI, EDO. DE MÉX.

1999

TESIS CON  
ALLA DE ORIGEN

301638



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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  
AVANZADA DE  
MÉXICO

UNIDAD DE LA ADMINISTRACIÓN ESCOLAR  
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

DR. JUAN ANTONIO MONTARAZ CRESPO  
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN  
PRESENTE

ATN: Q. Ma. del Carmen García Mijares  
Jefe del Departamento de Exámenes  
Profesionales de la FES Cuautitlán

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 gordolobo (*Gnaphalium oxyphyllum*)  
evaluada por la frecuencia de intercambio de cromátidas hermanas *in vivo*.

que presenta el pasante: Marco Antonio Luna Mendoza  
con número de cuenta: 9256307-2 para obtener el TÍTULO de:  
Químico Farmacéutico Biólogo

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

ATENTAMENTE.  
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

Cuautitlán Izcalli, Edo. de Méx., a 30 de Octubre de 199 8

PRESIDENTE Q.F.B. Maricela Noé Martínez Maricela Noé Martínez

VOCAL M. en C. Elizabeth Toriz García Elizabeth Toriz García

SECRETARIO M. en C. Sandra Díaz Barriga Arceo Sandra Díaz Barriga Arceo

PRIMER SUPLENTE Q.F.B. Ma. Virginia Oliva Arellano Virginia Oliva Arellano

SEGUNDO SUPLENTE Q.F.B. Guadalupe Koizumi Castro Guadalupe Koizumi Castro

# DEDICATORIAS

*A mis padres :*

*Ma. de los Angeles y Marco Antonio,  
por el cariño, apoyo y confianza que me  
han brindado siempre. Gracias papas*

*A mi hermana :*

*Araceli, por todos tus consejos y ayuda  
que me has dado durante todos estos años de estudio*

*A mi hermano :*

*Omar, por todo el cariño y amor  
que has transmitido a toda la familia*

## DICE

Índice de Figuras, Tablas y Gráficas	I
Abreviaturas	III
Resumen	V
Introducción	1
1.1. Mutágenos	1
1.1.1. Agentes físicos	1
1.1.2. Agentes químicos	3
1.1.2.1. Ciclofosfamida	5
1.1.2.2. Daunorrubicina	6
1.2. Mutación y Cáncer	13
1.3. Antimutágenos	15
1.4. Radicales libres	17
1.4.1. Tipos de radicales libres	18
1.4.2. Reacciones características de los radicales libres	20
1.4.3. Origen celular de los radicales libres	21
1.4.4. Química y reactividad de los radicales libres	22
1.4.5. Radicales libres y enfermedad	25
1.5. Antioxidantes	29
1.5.1. Sistemas antioxidantes enzimáticos	29
1.5.2. Sistemas antioxidantes no enzimáticos	32
1.5.2.1. Vitamina C	32

1.5.2.2. Vitamina E	33
1.5.2.3. Carotenoides	35
1.5.2.4. Glutati3n	36
1.5.2.5. Lazaroides	37
1.5.2.6. Ubiquinonas	37
1.5.2.7. Flavonoides	38
1.6. Gordolobo	46
1.7. Pruebas para la identificaci3n de agentes mutag3nicos	49
1.7.1. Intercambio de Crom3tidas Hermanas	51
Objetivos	54
Hip3tesis	54
Material y M3todos	55
Resultados	60
Discusi3n	67
Conclusiones	72
Bibliograf3a	73

## Índice de Figuras, Tablas y Gráficas

1. Esquema metabólico parcial de la ciclofosfamida	6
2. Estructura de la daunorrubicina	7
3. Estructura de la daunorrubicina intercalada dentro de los oligonucleótidos	8
4. Mecanismo de transferencia de electrones para dañar al ADN	9
5. Generación de radicales hidroxil de la semiquinona de antraciclina	9
6. Complejo férrico-daunorrubicina	10
7. Biotransformación de la daunorrubicina	12
8. Origen celular de los radicales libres	22
9. Las especies reactivas de oxígeno tienen un papel importante en el desarrollo del cáncer	27
10. Radical semidehidroascorbato	32
11. Estructura de la vitamina E	34
12. Radicales de la vitamina E	35
13. Estructuras de flavonoides	39
14. Esquema que muestra la tinción diferencial entre las cromátidas hermanas al adicionar BrdU en tres ciclos celulares	51
15. Factores estructurales involucrados en el mecanismo de antioxidantes	71

## Tablas

1. Agentes antimutagénicos que reducen la tasa de mutaciones espontáneas e inducidas	16
2. Descomposición de hidroperóxidos y peróxido de hidrógeno por enzimas	30
3. Frecuencia de ICH en los tratamientos del ensayo genotóxico	60
4. Índice mitótico en los tratamientos del ensayo genotóxico	61
5. Cinética de proliferación celular en los tratamientos del ensayo genotóxico	62
6. Frecuencia de ICH en el ensayo antigenotóxico	63
7. Índices mitóticos en el ensayo antigenotóxico	64
8. Cinética de proliferación celular en el ensayo antigenotóxico	65

## Gráficas

1. Frecuencia de ICH en los tratamientos del ensayo genotóxico	61
2. Índice mitótico en los tratamientos del ensayo genotóxico	62
3. Cinética de proliferación celular del ensayo genotóxico	63
4. Frecuencia de ICH en el ensayo antigenotóxico	64
5. Índice mitótico de los tratamientos en el ensayo antigenotóxico	65
5. Cinética de proliferación celular del ensayo antigenotóxico	66

## **Abreviaturas**

A	Adenina
ADN	Acido desoxirribonucleico
ADP	Difosfato de adenosina
ANOVA	Análisis de varianza
ATP	Trifosfato de adenosina
BrdU	5- Bromodeoxiuridina
C	Citosina
CF	Ciclofosfamida
CHO	Células de ovario de hamster chino
Cyt P-450	Citocromo P-450
COX	Ciclooxigenasa
s.e.	Desviación estándar
LD <sub>50</sub>	Dosis letal cincuenta
GCG	Té de catequinas
EMPR	Resonancia paramagnética electrónica
Fig	Figura
G	Guanina
SH	Glutación
SSG	Glutación oxidado
CH	Intercambio de Cromátidas Hermanas
M	Índice mitótico

I.	Índice de Inhibición
LDL	Lipoproteínas de baja densidad
LOX	Lipoxigenasa
M	Molar
MPO	Mieloperoxidasa
NAD	Dinucleótido de niacina-adenina
NADH	Dinucleótido de niacina-adenina reducido
NADP	Dinucleótido de niacina-adenina fosfato
NADPH	Dinucleótido de niacina-adenina fosfato reducido
PHPGX	Glutación hidroperóxido fosfolípido peroxidasa
RMN	Resonancia magnética nuclear
SOD	Superóxido dismutasa
T	Timina
TP	Té de polifenoles
TPG	Tiempo promedio de generación
TWE	Té verde
UV	Luz ultravioleta
i	Vía intraperitoneal
o	Vía oral
XO	Xantina oxidasa

## Resumen

Desde hace mucho tiempo se utilizan un gran número de plantas a las que se les atribuyen propiedades medicinales, entre éstas se encuentra el *Gnaphalium oxyphyllum*, originaria de México conocida tradicionalmente como Gordolobo, la cual se utiliza principalmente para el tratamiento de padecimientos respiratorios y para trastornos gástricos. A las plantas de este género se les han determinado propiedades antioxidantes así como de potentes promotores antitumorales, tal actividad debida a la presencia de flavonoides que se encuentran en estas plantas.

La presente investigación tuvo el objeto de conocer si esta especie de Gordolobo ejerce un efecto antigenotóxico en médula ósea de ratones expuestos al mutágeno daunorrubicina, mediante evaluación del número de intercambios de cromátidas hermanas (ICH).

Primariamente, para objeto de estudio genotóxico se dispusieron 4 lotes, distribuyéndose 5 ratones machos cepa NIH de 25 gr. de peso en cada lote, se les implantó una tableta de 5- bromodesoxiuridina, se les administró por vía oral el extracto acuoso de Gordolobo a dosis de 100 y 1000 mg/Kg, se incluyó un lote de testigos negativos (agua) y uno de testigos positivos (ciclofosfamida 50 mg/Kg). Los ratones se sacrificaron a las 24 hrs. con la administración previa de colchicina, y se llevó a cabo la obtención de la médula ósea para finalmente realizar la tinción diferencial para la visualización de los ICH.

Para el ensayo antigenotóxico, se prepararon 10 lotes, con 5 ratones cada uno con características similares a los anteriores. Los cuatro primeros lotes fueron administrados con el extracto de Gordolobo a las dosis de 50, 250, 500 y 1000 mg/Kg, a los cuatro siguientes se les administraron las mismas dosis de Gordolobo más daunorrubicina (10 mg/Kg). Los animales control se administraron con agua (negativo) y daunorrubicina (positivo) a la misma dosis. El procedimiento se continuó de la misma manera que para el ensayo genotóxico.

En los resultados obtenidos en el ensayo genotóxico no se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas en los ICHs entre el testigo negativo y los animales administrados con el extracto de Gordolobo. Con respecto a los resultados que se obtuvieron en el ensayo antigenotóxico, los animales tratados con el extracto de Gordolobo más la daunorrubicina mostraron diferencias estadísticamente significativas al compararlos con el control positivo (prueba t-student  $\alpha= 0.05$ ). Es decir hubo una disminución en el número de ICHs en los animales tratados con Gordolobo a las dosis de 250, 500 y 1000 mg/Kg más daunorrubicina, con respecto al testigo positivo; el índice de inhibición fué en un porcentaje del 11, 53, y 61 % respectivamente.

# 1. INTRODUCCION

## 1.1. Mutágenos

Una mutación se considera como un cambio en la secuencia de las bases nitrogenadas que constituyen al ácido desoxirribonucleico (ADN). Un mutágeno es cualquier agente capaz de producir una mutación. Los agentes mutagénicos son de distinta naturaleza y pueden corresponder a agentes físicos como la luz ultravioleta y las radiaciones o a un gran número de sustancias químicas, entre las que se incluyen fármacos empleados para tratamientos terapéuticos. Existen dos amplias categorías de mutágenos químicos, los de acción directa y los de acción indirecta, requiriendo estos últimos una posterior activación metabólica para convertirse en mutágenos.

Los mutágenos pueden producir mutaciones que ocurren en las células somáticas o en las células gaméticas. En el primer caso están relacionadas con la aparición del cáncer (cancerígeno), con el proceso de envejecimiento celular, y cuando el daño se produce durante la gestación (teratógeno) (Salamanca, 1990).

### 1.1.1. Agentes Físicos

Los agentes físicos que incluyen a las radiaciones y que son las más importantes en la mutagénesis pueden ser divididas en dos categorías, radiaciones ionizantes y radiaciones no ionizantes. Entre las primeras se hallan los rayos X y los rayos gamma; los rayos alfa y los rayos beta; los electrones, los neutrones, y los protones. Entre las radiaciones no ionizantes se encuentra la luz visible y la luz ultravioleta (UV) que tiene importancia desde el punto de vista de sus efectos mutagénicos (Levine, L. 1979).

Las radiaciones ionizantes presumiblemente causan rompimiento en el ADN por acción directa de la energía de radiación rompiendo los enlaces fosfodiéster o indirectamente de la interacción de sustancias reactivas formadas en la célula por energía de radiación con el ADN. Se ha visto que

los rompimientos en la doble cadena a ADN son producidos intracelularmente en presencia de oxígeno y tienen una relación lineal con la dosis de la radiación. Los rompimientos de una sola cadena, son iniciados por pérdida de un átomo de hidrógeno en una desoxirribosa formando un radical. El radical reacciona con el oxígeno para formar un radical peroxi y romper la cadena (Wagner, 1992).

Si estos rompimientos ocurren en el mismo cromosoma, pueden dar lugar a deficiencias e inversiones. Si las roturas ocurren en cromosomas no homólogos se pueden producir translocaciones. Estas radiaciones también pueden producir mutaciones puntuales.

*Cuando los ácidos nucleicos absorben luz UV, la energía absorbida puede producir alteraciones en las características de enlace de las purinas y las pirimidinas. Se ha visto que estas últimas son más propensas a estos cambios que las purinas. Una de las consecuencias de la alteración de las características de enlace consiste en la formación de enlaces covalentes entre pirimidinas adyacentes de la misma cadena de ADN. Las pirimidinas unidas reciben el nombre de dímeros. De los tres tipos posibles de dímeros que se pueden formar, el dímero de timina es el que se forma con mayor facilidad. La dimerización interfiere en el apareamiento correcto de la timina con la adenina y puede dar lugar a que la timina se aparee con la guanina; esto produciría una transición de A-T a C-G. Otros fotoproductos como los dímeros de citosina, se forman en menor cantidad y producen mutaciones al ser desaminados y convertidos en dímeros de uracilo, puesto que este actúa como la timina, esto dará lugar a una transición de G-C a A-T (Levine, L. 1979).*

En los dímeros de timina, estas dos pirimidinas compiten por uniones de hidrógeno a bases complementarias (AA) situadas en la cadena complementaria, los dímeros de timina producen una distorsión local en el ADN. Esta clase de lesiones interrumpe la acción de la ADN polimerasa no reconociendo ahora la copia de estas dos timinas, la replicación se ve bloqueada a este nivel y

puede resultar en muerte celular, mutaciones sin sentido y rompimiento de la hebra, a no ser que sea reparado (Etienne, D. 1988; Wagner, 1992).

### 1.1.2 Agentes Químicos

Los compuestos químicos que resultan mutagénicos pueden ser agrupados según sus propiedades y sus mecanismos de inducción del fenómeno mutacional (Salamanca, 1990).

Los análogos de bases son bases púricas o pirimídicas que difieren ligeramente a las encontradas en el ADN. Tales bases son el 5-bromouracilo (5-BrU) y las 2-aminopurinas. La manera en la cual los análogos de base producen mutaciones, es mediante la incorporación de la base análoga durante la replicación del ADN y un apareamiento equivocado con otra base nitrogenada de la cadena complementaria. Ejemplos de este tipo de mutación es el 5-BrU, dando como resultado las transiciones GC a AT ó AT a GC.

Otro mecanismo por el cual se producen transiciones del mismo tipo, es por la desaminación de la citosina a uracilo y de la adenina a la hipoxantina (la cual se aparea igual que la guanina); estas desaminaciones son provocadas por el mutágeno ácido nitroso.

Los agentes alquilantes son otro grupo de mutágenos conocidos, entre estos se encuentran las mostazas nitrogenadas, el metil metano sulfonato y las etilen-eneimina. Estos compuestos producen la alquilación en las bases del ADN, la base más vulnerable es la guanina que es atacada más frecuentemente en los sitios O y el N 9

El daño que causan los agentes alquilantes al ADN son el detenimiento en la replicación y por consecuencia de la división celular, siendo estas mutaciones letales, por lo que son usados como agentes antineoplásicos (Goodman, 1994). También los agentes alquilantes pueden provocar rupturas cromosómicas, esto es, cuando se remueve la base alquilada se forma un espacio que puede desencadenar en una doble ruptura (Rothwell, 1983)

Existe otro tipo de compuestos químicos, como los colorantes derivados de la acridina, o como los antibióticos antracídicos, que se intercalan en la doble hélice del ADN, en general son moléculas aromáticas o heteroaromáticas con series de anillos planos que tienen la propiedad de insertarse entre los pares de bases de la doble hélice. Esta intercalación se da por la interacción en la transferencia de cargas, en enlaces de hidrógeno, y fuerzas electroestáticas. La interacción es no covalente, lo cual hace que la hélice este rígida, causa que los pares de bases se separen verticalmente, y que además distorsione la unión azúcar-fosfato. La destrucción de la estructura regular de la hélice, hace que se desenrolle el ADN, interfiriendo con la acción de las enzimas que se unen al ADN como la topoisomerasa, alterando el grado de superenrollamiento, y la ADN polimerasa (Silverman, 1992). Puede provocar mutaciones por corrimiento, desfasamiento y translocamiento. Algunos originan uniones entre las bases de la misma o diferente cadena (Salamanca, 1990).

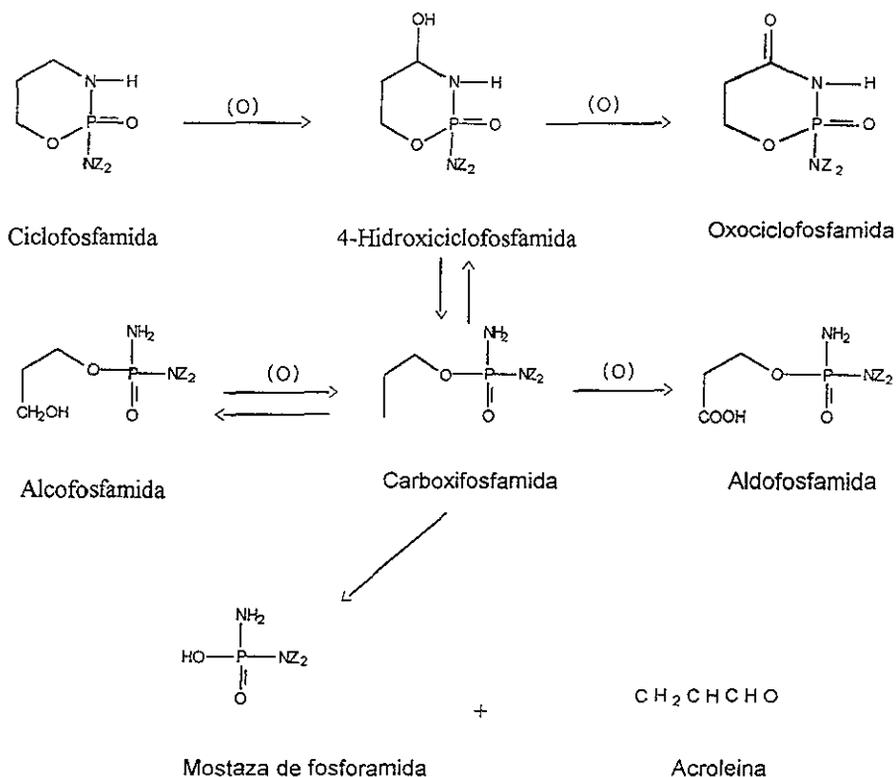
Existen fármacos anticancerígenos que son conocidos por actuar en la enzima topoisomerasa II, para estabilizarse en un complejo ternario ADN-fármaco-topoisomerasa II. Este complejo puede conducir a eventos de recombinación ilegítima, así como a la formación de otras lesiones. La genotoxicidad mediante la topoisomerasa II depende fuertemente del status del ciclo celular de la célula blanco. Algunos de los efectos que causan estos agentes directos de la enzima topoisomerasa II, es la reducción, condensación y fragmentación de la cromatina, e interferencia con la acción de la polimerasa (Ferguson, 1994).

### 1.1 2.1. Ciclofosfamida

La ciclofosfamida (CCF) es un citotóxico no específico del ciclo celular, es un agente antiproliferativo el cual es usado en diversos problemas médicos como neoplasias, trasplante de tejidos y enfermedades inflamatorias. Químicamente es un bioprecursor inerte de una potente mostaza nitrogenada de un agente alquilante (Wermuth, 1996).

Este compuesto es usado ampliamente como fármaco anticancerígeno, principalmente por su toxicidad en células tumorales hipóxicas. La CCF es activada metabólicamente por enzimas microsomales de el sistema citocromo P-450 antes de la ionización de los átomos de cloro y la formación subsecuente del ion cíclico etilendiamonio. La reacción metabólica inicial es la oxidación a 4-hidroxiciclofosfamida, seguida de la deshidrogenación de este compuesto y de la aldofosfamida, el compuesto se desactiva a los metabolitos urinarios 4-oxociclofosfamida y carboxifosfamida, mientras que la aldofosfamida se mantiene en equilibrio redox con la alcofosfamida. En células tumorales relativamente anaeróbicas, los metabolitos biológicamente activos son la mostaza fosforamida y el metabolito tóxico acroleina, que son producidos por la aldofosfamida en una reacción limitante de  $\beta$ -eliminación. Esto puede ser notado en que la 4-hidroxiciclofosfamida esta también en equilibrio de hidratación/deshidratación con la correspondiente forma amino. (Fig 1).(Testa, 1995; Silverman, 1992; Craig, 1990).

La CCF es la mostaza nitrogenada más versátil y más usada en exámenes preclínicos, posee un amplio espectro de actividad de todos los agentes alquilantes; la administración de la CCF ejerce sus efectos citotóxicos en virtud de su capacidad para entrecruzar las cadenas del ADN, reacciona con los dos compuestos cloro-etil con una base del nucleótido adyacente (Craig, 1990, Smith, 1993)



Z= CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-Cl

Fig 1. Esquema metabólico parcial de la ciclofosfamida (Testa, 1995)

### 1.1.2.2. Daunorrubicina

La daunorrubicina es un antibiótico antracíclico que es producido por el hongo *Streptococcus peucetius var. caesus*, existen otros antibióticos antracíclicos de igual naturaleza que difieren un poco en su estructura química y que se emplean para el mismo fin. La daunorrubicina se ha empleado preferentemente contra leucemias agudas. La utilidad clínica de este agente queda limitada por la aparición de cardiomiopatías, cuya presencia depende de la dosis letal del fármaco (Goodman, 1996)

Los antibióticos antracíclicos poseen estructuras anulares tetracíclicas con un azúcar poco común, la daunosamina, unida por enlace glucosídico. Los agentes citotóxicos de esta categoría tienen fracciones quinona e hidroquinona en anillos vecinos, lo cual les permite actuar como agentes receptores y donadores de electrones. (Fig.2).

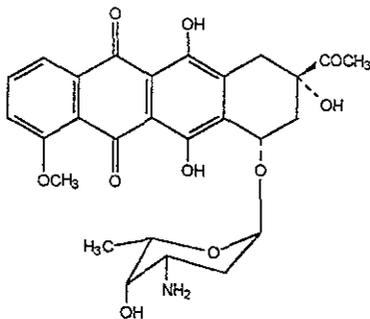


Fig 2. Estructura de la daunorrubicina (Westendorf, 1984)

Existen algunas controversias en cuanto al mecanismo de acción de este compuesto ya que ejerce diferentes acciones biológicas, en síntesis puede haber varias posibilidades en las que la daunorrubicina produzca daño al ADN:

- a) Por intercalación
- b) Producción de radicales libres (de semiquinona, O<sub>2</sub><sup>-</sup>, ·OH)
- c) Formación de complejo férrico
- d) Por alquilación

Por intercalación.

Este compuesto es característico por su habilidad de intercalarse dentro del ADN, forma el complejo ternario con la topoisomerasa II y el ADN, provocando la inhibición de la replicación y de la transcripción. Estudios con rayos X y resonancia magnética nuclear (RMN) de un modelo del complejo daunorrubicina-oligonucleótido muestra que los oligonucleótidos forman seis pares de bases a la derecha de la doble hélice con dos moléculas de daunorrubicina intercaladas en la

secuencia d(CpG). El cromóforo tetracíclico está orientado ortogonalmente a lo largo de la dimensión de los pares de bases, y el anillo que tiene el sustituyente aminoazúcar empuja hacia el interior del surco menor, (Fig 3). Los sustituyentes en este anillo unen al hidrógeno al par de bases por encima y debajo del sitio de intercalación. El aminoazúcar casi cubre el surco menor, pero sin unirse al ADN. El complejo es estabilizado por energía estática y por enlaces de hidrógeno a los grupos hidroxil y carbonil del C-9 de el anillo con el sustituyente (Silverman, 1992; Gringauz, 1997).

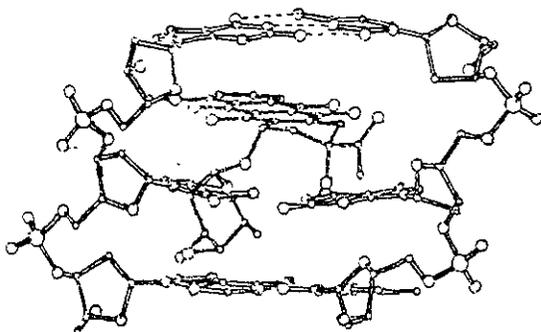


Fig 3. Estructura de la daunorrubicina intercalada dentro de oligonucleótidos

(Silverman, 1992)

#### Producción de radicales libres.

Otro mecanismo de daño al ADN es la transferencia química de electrones. La reducción de un electrón de la antraciclina, catalizada por flavoproteínas como la NADPH- citocromo P-450 reductasa, produce el radical de semiquinona de la antraciclina, (Fig 4). , el cual puede transferir un electrón al oxígeno para regenerar la antraciclina y producir superóxido ( $O_2^{\cdot -}$ ). Ambos el superóxido y los radicales aniones de semiquinona de la antraciclina pueden generar el radical hidroxil ( $\cdot OH$ ) (Fig 5), el cual es conocido por dañar al ADN(Goodman, 1996, Silverman, 1992).

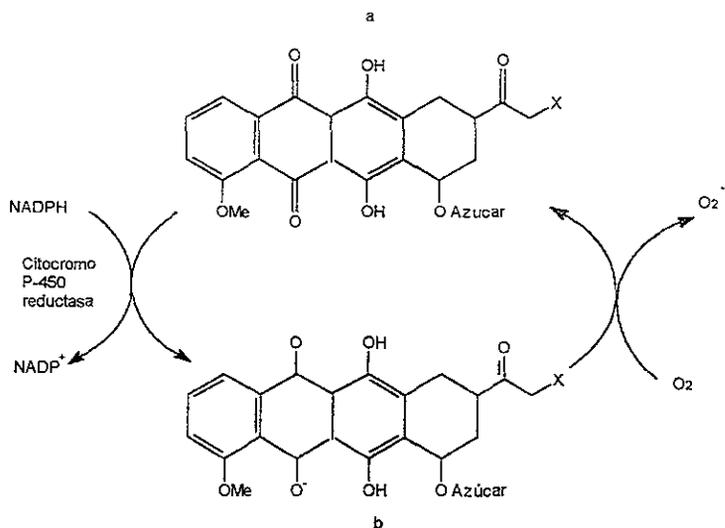


Fig 4. Mecanismo de transferencia de electrones para dañar al ADN (Silverman, 1992)

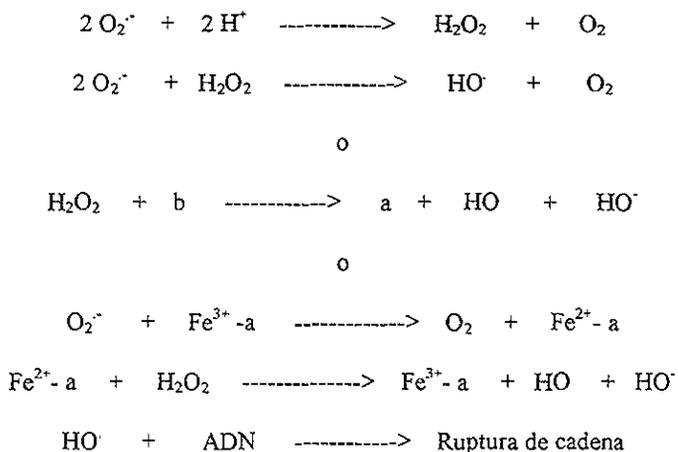


Fig 5 Generación de radicales hidroxil de la semiquinona de antraciclina (Silverman, 1992)

Formación del complejo férrico.

Una tercera posibilidad para provocar el daño al ADN por la daunorrubicina, es la formación de un complejo férrico, el cual se une al ADN por un mecanismo diferente al de intercalación y

significativamente muy fuerte. Este complejo férrico puede reaccionar con superóxido para dar oxígeno y el correspondiente complejo ferroso, (Fig.6). La reducción del ion ferroso con el peróxido de hidrógeno es conocida como reacción de Fenton, la cual es usada en el método estandar para la generación de radicales hidroxil cuando se hace marcage de ADN (Silverman, 1992).

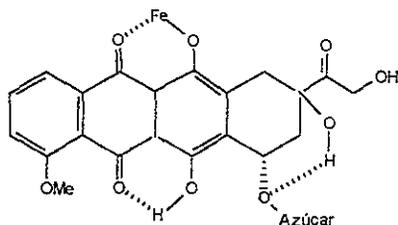


Fig 6. Complejo férrico-daunorrubicina (Silverman, 1992)

Como la generación de los radicales hidroxil ocurre adyacente al ADN, es improbable que los atrapadores de radicales pudieran ser un método efectivo de protección celular, como fue demostrado con antibióticos de antraciclina en la inducción de toxicidad cardiaca (Gringauz, 1997).

#### Por alquilación

Un cuarto mecanismo propuesto para la acción de las antraciclina involucra una reducción de dos electrones para reducir la antraciclina, el cual se piensa causa la eliminación espontánea del azúcar (Schreiber, 1987). Esto podría generar un receptor Michael, el cual puede ser capaz de alquilar al ADN (Fig 7). Sin embargo, se ha encontrado que es muy difícil que la daunorrubicina sufra la eliminación del azúcar. Posiblemente la eliminación del azúcar ocurre con el estado de oxidación de la semiquinona (Wermuth, 1996, Silverman, 1992)

Las actividades biológicas de las antraciclinas son de alta complejidad. Se ha detectado la oxidación de bases del ADN en células apoptóticas después de la inducción de la daunorrubicina, siendo más frecuente la 8-hidroxiguanina, incrementándose significativamente conforme aumenta la dosis; así como también se ven aumentados los rompimientos de las cadenas ADN, indicando estos resultados que la muerte celular está relacionada con el daño oxidativo del ADN (Muller, 1997).

Los antibióticos antitumorales de antraciclina como potentes agentes genotóxicos y carcinógenos, se han investigado, con la finalidad de observar los diferentes efectos que presenta en diversos organismos; los estudios revelan que son altamente activos en ensayos de mutagénesis en *Salmonella typhimurium* y en células de hamster chino V79 (Westendorf, 1994). A los derivados antracíclicos como parte de regímenes de tratamientos contra el cáncer, se les ha determinado el daño que pueden ocasionar en diferentes órganos, a parte de la bien conocida cardiomiopatía que pueden originar; y se ha encontrado que causan neurotoxicidad en ratas, además de ser hepatotóxicas, y se ha visto que las vitaminas E y C tienen un efecto protector antioxidante en hepatocitos (Chibowsky, 1996; Joshi, 1996)

Existen investigaciones que indican que altas dosis de daunorrubicina inducen peroxidación de lípidos en tejido renal de ratas, estimulando la activación de DT-diaforasas y destoxificación mediante glutatión (GSH) (Dioudis, 1996).

La resistencia a la daunorrubicina es atribuido a la elevada expresión del gen de la glicoproteína P170 que bombea el fármaco fuera de la célula, para disminuir la actividad de la enzima de reparación topoisomerasa II, y para aumentar la producción de glutatión, el cual atrapa a los radicales libres y peróxidos.

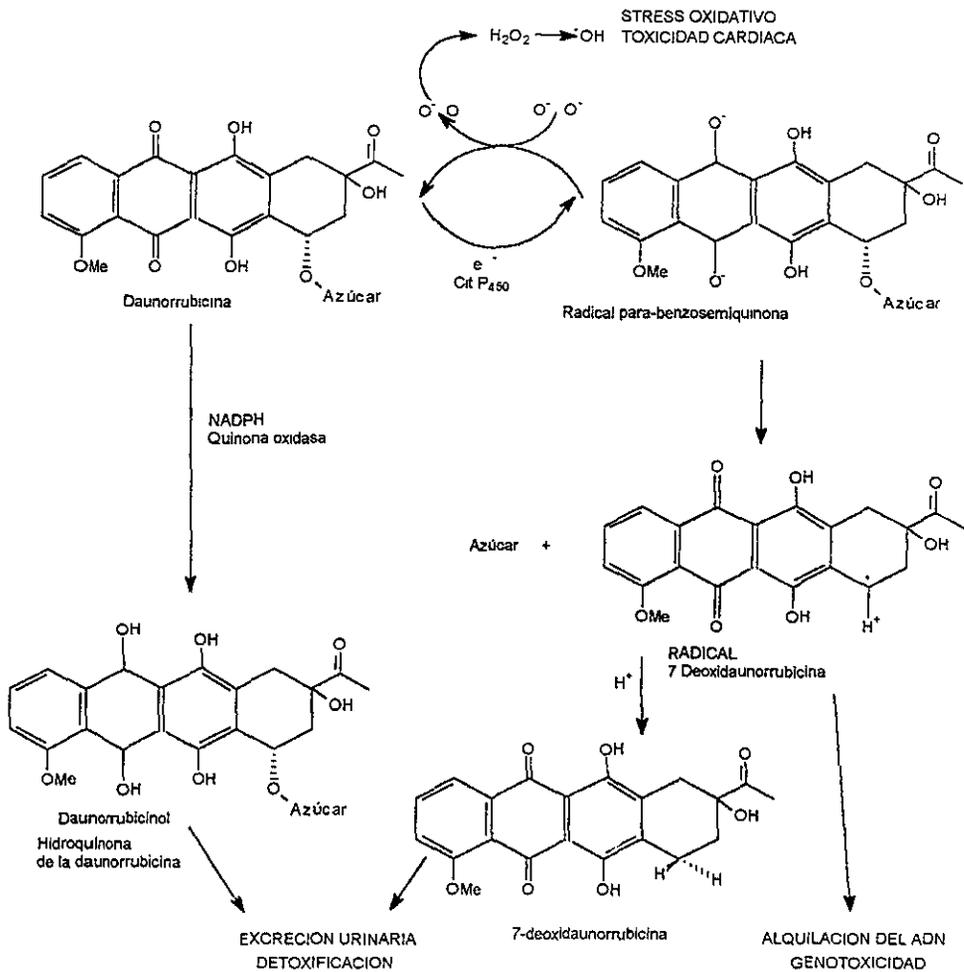


Fig. 7. Biotransformación de la daunorrubicina

## 1.2. Mutación y Cáncer

Aunque pocas formas de cáncer son asociadas con la niñez, para la mayoría de los cánceres la incidencia aumenta marcadamente con la edad. Por ejemplo, la tasa de muerte de cáncer de intestino grueso, aumenta más de mil veces entre las edades de 30 y 80, y esto es típico en muchos cánceres; el cáncer surge cuando una célula acumula diversas mutaciones específicas. Las mutaciones pueden ocurrir en algún tiempo, la probabilidad de que una célula en particular pueda adquirir una mutación incrementa en proporción directa con la edad (Watson, 1987).

Hay evidencia sustancial de que las mutaciones son necesarias para causar cáncer. Para la primera mitad de este siglo, muchas investigaciones fueron enfocadas en identificar agentes que pudieran inducir mutaciones y por consiguiente cánceres en experimentos en animales. Los primeros agentes que fueron encontrados fueron los virus, eventualmente ciertos químicos y también la radiación fueron mostrados para inducir tumores en animales y células transformadas en cultivos de tejidos; con el entendimiento profundo de que el mecanismo de acción de estos agentes inducían cáncer a nivel de ADN. Hoy, esto es ampliamente aceptado de que el cáncer es una enfermedad de un mal funcionamiento celular de genes o una innecesaria expresión genética viral (Ballantyne, 1993).

Existen evidencias importantes que sostienen el concepto de que la mayoría de los cánceres humanos surgen de la interacción entre el ambiente (incluyendo a la dieta, el cigarrillo, etc ) y el material genético de las células, y no de simples predisposiciones hereditarias; esto deriva de la observación de que emigrantes adquieren rápidamente el riesgo de cáncer de la ciudad. Se han acumulado evidencias epidemiológicas que muestran que la mayoría de los cánceres están asociados a factores ambientales y estilos de vida, tales como exposición a productos químicos y radiaciones, hábitos de fumar, prácticas sexuales , etc (Flores, 1995).

Se cree que los productos químicos son culpables en la mayoría de los casos, y que un porcentaje menor los virus son responsables de cánceres en humanos, los virus causantes de cáncer han sido estudiados ampliamente en experimentos con animales, estos estudios condujeron al descubrimiento de que genes de cáncer celulares, llamados oncogenes, pueden ser activados por virus, radiación y carcinógenos químicos. Los oncogenes son genes que se han identificado en células transformadas; en células normales, están totalmente inactivados y se les denomina protooncogenes, su función es durante el desarrollo y finaliza en una etapa determinada del crecimiento celular.

Estudios epidemiológicos han implicado a los virus como agentes etiológicos solamente en ciertos cánceres. Estos incluyen el virus de Epstein-Barr (que causa el linfoma Burkitt y linfoma nasofaríngeo), el virus de la hepatitis B y C (causa cáncer de hígado), el papilomavirus humano (causa cáncer cervical) y el virus de leucemias de células T.

La radiación ultravioleta es el agente que ha sido reconocido como el mayor causante de cáncer de piel, con excepción del melanoma maligno. Las radiaciones están involucradas en variedades de cánceres, particularmente en aquellos que comprenden el sistema linfático y la sangre, pero también en cáncer de mama, cerebro y tiroides.

Los productos químicos en el desarrollo del cáncer fueron asociados cuando se observó que el contacto prolongado con hollín, alquitrán de hulla, petróleo, aumentaba la aparición de cáncer en la piel, pulmón y otros tejidos. Cuando se logró sintetizar compuestos químicos puros, como los hidrocarburos policíclicos aromáticos (por ejemplo el benzo(a)pireno), se establecieron experimentos en animales, induciendo la formación de cánceres de piel en roedores, como resultado de la aplicación directa.

Uno de los más importantes químicos para la población, son los constituyentes del humo del tabaco; otros incluyen productos derivados de la combustión, constituyentes de la comida o los

formados durante la preparación de ésta (por ejemplo, nitrosaminas, hidrazinas, triacenos, aminas heterocíclicas, etc). También se ha reconocido que los carcinógenos pueden ser producidos endógenamente a través de procesos fisiológicos como la inflamación, stress oxidativo, desbalances nutricionales y hormonales, y lesiones repetidas en tejidos (Ames, 1983).

### **1.3. Antimutágenos**

A las sustancias capaces de contrarrestar o disminuir el daño mutagénico independientemente de los mecanismos involucrados se les conoce como antimutágenos (Ames, 1983).

Los antimutágenos son clasificados de acuerdo a sus mecanismos de acción o a la etapa en la cual ejercen sus acciones (Tabla 1). Existen diversas clasificaciones de antimutágenos; Ramel y Alekperov, clasifican a los inhibidores de mutagénesis dependiendo de la etapa en la cual desempeñan sus efectos protectores: la etapa 1 involucra a aquellos inhibidores que intervienen extracelularmente, al prevenir la formación de químicos genotóxicos de compuestos precursores, y la etapa 2 a los que actúan intracelularmente, denominados bloqueadores que impiden que compuestos genotóxicos alcancen sitios blanco en la célula (Ramel, 1986). De otro modo, Kada clasificó a estas sustancias como, a aquellas que actúan antes de la reacción de un mutágeno con el ADN como “dismutágenos”; estos comprenden compuestos de alto peso molecular, inhibidores sobre la acción metabólica de mutágenos, y agentes que interfieren con la producción de mutágenos a partir de sus precursores químicos; este parece ser el mecanismo más selectivo por el cual los componentes de la dieta ejercen los efectos sobre el mecanismo de los compuestos y la carcinogénesis. Así también, Kada propuso el término “biomutágeno” para las sustancias antimutagénicas que reducen la frecuencia mutacional después de que el ADN ha sido dañado por mutágenos (Ramel, 1986; Wattenberg, 1985).

1. Inhibidores que actúan extracelularmente (dismutágenos)
- inhibición de mutágenos o sus precursores
- inhibición de la formación de mutágenos endógenos
- inactivación de mutágenos (física/química/enzimática)
2. Inhibidores que actúan intracelularmente:
- modulación del metabolismo (inhibición de activación de promutágenos) (inducción de mecanismos detoxificantes)
- moléculas reactivas bloqueadoras (reacción con electrofilos) (atrapadores de radicales de oxígeno: antioxidantes)
- modulación de la replicación y reparación del ADN (biomutágenos) (aumento en la reparación del daño al ADN) (bloqueando los errores en los procesos de reparación)
3. Inhibidores que actúan en la iniciación de células neoplásicas (moduladores de la promoción y progresión de tumores)

Tabla 1 . Agentes antimutagénicos que reducen la tasa de mutaciones espontáneas e inducidas (Graf, 1997)

Existen estudios anteriores que mostraron que los componentes de la dieta pueden impedir la carcinogénesis por lo siguiente : bloqueo de la activación metabólica que es controlado por reacciones de oxidación o conjugación., incrementan la detoxificación metabólica y proporcionan blancos alternativos para metabolitos electrofilicos. Los compuestos fitoquímicos en particular han incrementado los niveles de glutatión, glutatión transferasa y glucuronil transferasa para facilitar la destrucción de electrofilos y oxidantes reactivos (FNPC, 1997).

Nutrientes esenciales que mostraron la inhibición química de tumores inducidos incluyendo a la vitamina A, la cual mostró la inhibición de la formación de carcimoma en tejido epitelial por hidrocarburos policíclicos aromáticos; riboflavin, que inhibe el cáncer de hígado causado por colorantes azo en ratas, además quercetina , un flavonoide que ha mostrado marcadamente la supresión del efecto promotor de la telocidina en la formación de papilomas en piel de ratón (Nishino, 1984).

En estudios epidemiológicos recientes se sugieren patrones de dieta protectivos, estas investigaciones proponen que dietas ricas en vegetales y frutas se asocian con una reducción del riesgo de cáncer en una variedad de órganos. Modulaciones de la dieta en el proceso de cáncer se han aplicado a todas las clases de químicos. Los nutrientes muestran efectos regulatorios en cánceres experimentales, incluye: macronutrientes (grasas, carbohidratos, proteínas y fibra); vitaminas (ácido fólico, riboflavina,  $\beta$ -caroteno, retinol,  $\alpha$ -tocoferol y vitamina B12); y minerales (selenio, zinc, magnesio y calcio). Muchos de estos efectos moduladores observados en animales han sido también reportados en estudios epidemiológicos en humano (FNPC, 1997).

#### **1.4. Radicales Libres**

Los radicales libres son especies químicas que tienen un único electrón en su orbital externo. En tal estado, el radical es extremadamente activo e inestable y reacciona con sustancias químicas orgánicas (proteínas, lípidos, carbohidratos) e inorgánicas, particularmente con moléculas de la membrana y ácidos nucleicos. Más aún, los radicales libres inician reacciones autocatalíticas en las que las moléculas con las que se relacionan se convierten en radicales libres, propagando así la reacción dañina en cadena (Balz Frei, 1994)

Los radicales libres pueden ser iniciados dentro de las células: 1) por absorción de energía radiante (por ejemplo, luz UV, rayos X), 2) por reacciones endógenas, generalmente oxidativas, que ocurren durante los procesos metabólicos normales, ó 3) por el metabolismo enzimático de sustancias químicas exógenas o fármacos (por ejemplo, el tetracloruro de carbono). Casi cualquier átomo puede tener en su orbital externo un único electrón, pero el oxígeno y el carbono son los de mayor relevancia biológica (Robbins, 1990).

Existen muchas enfermedades en las cuales los radicales libres han sido implicados, en parte porque estas moléculas reactivas pueden producir cambios en los tejidos identificados durante la expresión de una variedad de toxicidades y procesos degenerativos. Sin embargo, muchas de las transformaciones químicas observadas en tejidos podrían ser consecuencia de daños producidos a través de otros mecanismos. Con muy pocas excepciones, estableciendo cuales radicales son participantes significativos en la iniciación o progresión de una especie tóxica o enfermedad (Balz Frei, 1994).

#### 1.4.1. Tipos de Radicales Libres

La autooxidación, procesos bioquímicos, radiaciones y muchos otros agentes y procesos son conocidos por generar radicales libres. Una amplia variedad de radicales pueden ser generados en biosistemas por su compleja composición. Los radicales libres pueden ser convenientemente agrupados de acuerdo a sus características de reactividad química. Basado en sus propiedades químicas los radicales pueden ser situados arbitrariamente dentro de dos categorías: radicales localizados y deslocalizados, o radicales resonantes.

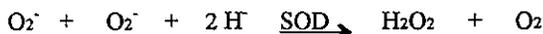
**Radicales localizados.** El electrón impar es localizado predominantemente en uno de los átomos de la molécula. Basado en el tipo de átomo en el cual ellos residen, además están subdivididos dentro de los siguientes grupos: C (  $\text{R-CH-R}'$  ); O u Oxy (  $\cdot\text{OH}$ ,  $\text{ROO}\cdot$ ,  $\text{RO}\cdot$ ,  $\cdot\text{O}_2^-$  ); N (  $\text{R}_2\text{N}\cdot$  ), S (  $\text{RS}\cdot$  ); y otros.

**Radicales deslocalizados o radicales resonantes.** El electrón impar está distribuido entre diferentes átomos dentro del radical. Consecuentemente, el radical tiene diferentes formas mesoméricas y es estabilizado por resonancia. Ellos además pueden ser subdivididos en: Alifáticos (bisalicólicos, aductos); Aromáticos (radicales fenoxi y ciclohexadienil); Heterocíclicos ( guanil, adenil, aductos heterocíclicos) (Simic, 1988).

Radicales derivados del oxígeno. Como es bien sabido el oxígeno normalmente sufre una reducción de cuatro electrones al pasar a H<sub>2</sub>O, catalizado por la citocromo-oxidasa. Sin embargo, la presencia de oxígeno intracelular también permite la producción inadvertida de especies de oxígeno intermedias parcialmente reducidas, tóxicas. Las formas más importantes son el superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), el peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) y los iones hidroxilo (·OH). Estas formas pueden producirse por la actividad de diversas enzimas oxidativas, en diferentes sitios de la célula: citosol, mitocondrias o enzimáticamente, por las enzimas citoplasmáticas como la xantina oxidasa, el citocromo P-450 y otras oxidasas



Una vez producido el superóxido puede ser inactivado espontáneamente o, más rápidamente por la enzima superóxido dismutasa (SOD), formándose H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.



El peróxido de hidrógeno es producido por dismutación de O<sub>2</sub><sup>-</sup>, como ya se ha explicado o directamente por las oxidasas presentes en los peroxisomas.

Los radicales hidroxilo son generados 1) por la hidrólisis de agua producida por las radiaciones ionizantes o por, 2) interacción con metales transicionales (por ejemplo, hierro y cobre) en la reacción de Fenton



en la reacción de Haber-Weiss



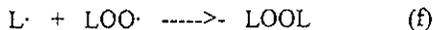
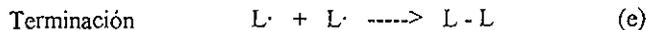
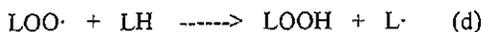
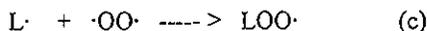
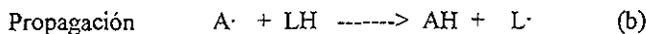
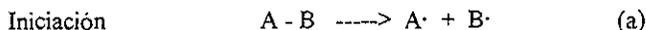
El hierro es particularmente importante en la lesión tóxica del oxígeno. La mayor parte del hierro libre está en forma férrica (Fe III) y debe ser reducido a ferroso (Fe II) para ser activo en la

reacción de Fenton. Esta reacción puede ser magnificada por el superóxido, por lo que es importante en la generación de  $\cdot\text{OH}$  (Robbins, 1990)

#### 1.4.2. Reacciones características de los radicales

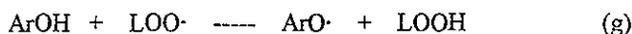
Existen tres clases de reacciones de radicales que son reconocidas; extracción del átomo, transferencia de electrones y adición del radical (Smith, 1992). Productos característicos de estas reacciones generales han sido identificados en sistemas biológicos y estudiados en relación a la lesión de tejidos.

Además, lo importante de las reacciones de radicales es su potencial para proceder en reacciones en cadena que mantienen entre sí mismos, consistiendo de reacciones de iniciación y propagación. Las reacciones de iniciación resultan en la creación de especies con electrones impares. La hendidura homolítica de peróxidos o compuestos azo son ejemplos de reacciones de iniciación de radicales (a). Las reacciones de propagación son aquellas en la cual el carácter del radical es retenido o transferido (b,c,d) (LH, molécula lipídica, L $\cdot$ , radical del carbón, LOO $\cdot$ , radical lipídico peroxil; LOOH, hidroperóxido lipídico).



Las reacciones de propagación usualmente acontecen por la vasta mayoría de los productos de formación de procesos de radicales libres, como en la peroxidación de lípidos no enzimática. Las reacciones de terminación resultan en la conversión de radicales en productos spin pares (e,f).

La reacción inicial de la vitamina E y otros antioxidantes fenólicos (ArOH) con radicales lipídicos intermedios (LOO·) es la transferencia del átomo de H fenólico, de este modo extinguiendo o atrapando el intermediario LOO·, pero generando el correspondiente radical fenoxil (ArO·) (g). Aunque no formalmente terminada la cadena radical, los radicales fenoxil sirven para ser menos reactivos en una matriz biológica (Balz Frei, 1994).



#### 1.4.3. Origen celular de los radicales libres

Los radicales de oxígeno y especies relacionadas con radicales libres son generados en la célula como parte de productos del metabolismo normal (Fig 8) (Das, D. 1990). La importancia del origen de los radicales en algún desorden específico es muchas veces desconocido, y el papel relativo que juegan en las lesiones de los tejidos varía con las condiciones experimentales específicas empleadas. Parece probable que la formación de radicales es frecuentemente secundario al proceso de la enfermedad primaria. Por ejemplo, siguiendo muchos tipos de tejido lesionado, incluyendo trauma, células con ruptura y liberación de su contenido. Ese contenido incluye iones de metales de transición que pueden catalizar rápidamente transformaciones a radical y lesionar tejidos. La activación de fagocitos y la ruptura de la función mitocondrial pudiera también resultar en la formación de exceso de especies reactivas de oxígeno, porque estos procesos rutinariamente están acompañados de lesión de tejidos

Las reacciones redox ocurren durante el transporte de electrones en organelos subcelulares o en la membrana, son responsables de la generación de aniones superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y radicales hidroxil ( $\cdot OH$ ). De esta manera la mitocondria, peroxisomas, núcleo, el retículo endoplásmico son sitios de formación de radicales oxi bajo condiciones fisiológicas (Freeman, 1982)

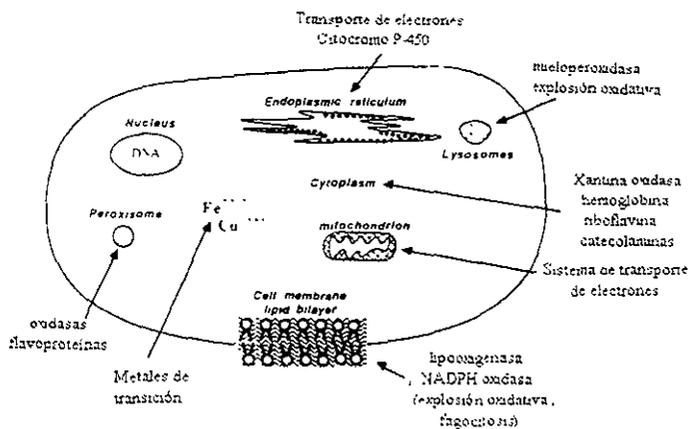


Fig. 8. Origen celular de radicales libres (Balz Frei, 1994)

#### 1.4.4. Química y reactividad de los radicales libres en sistemas biológicos

Los radicales libres en biomoléculas pueden conducir a una variedad de consecuencias biológicas como mutaciones, daño al sistema inmune, etc. (Simic, 1988). La exposición de tejidos a radicales libres y oxidantes en diversos sistemas experimentales han documentado la capacidad de estas especies para producir daño. Lípidos, proteínas y ADN son capaces de reaccionar con radicales y oxidantes, y se han observados cambios que proporcionan una explicación de el resultado de daño a células o tejidos. En general, parece que el efecto acumulativo de cambios

inducidos por radicales libres es la causa más inmediata de la muerte celular (Robbins, 1990; Balz Frei, 1994).

**Lípidos.** Los lípidos han sido ampliamente estudiados por su estructura y funcionamiento crítico en las membranas, y por su relativa facilidad con la cual la producción de peroxidación de lípidos pueden ser medidos

La peroxidación de lípidos inicia por los radicales hidroxilo, que reaccionan con los ácidos grasos insaturados de los fosfolípidos de la membrana, para generar radicales libres de ácidos orgánicos, que, a su vez, reaccionan rápidamente con el oxígeno formándose peróxidos. Los peróxidos a su vez, actúan entonces como radicales libres, iniciando una reacción catalítica en cadena que da lugar a una mayor pérdida de ácidos grasos insaturados y a una extensa lesión de la membrana (Robbins, 1990).

**Proteínas.** En años recientes las proteínas han recibido la mayor atención como blanco para reaccionar con radicales libres. La oxidación de proteínas puede llegar a una disminución de grupos sulfidrilo, además de modificación de aminoácidos llegando a la formación de carbonilos y otros compuestos oxidados. La oxidación de proteínas son mucho más susceptibles a la proteólisis y a la acumulación de grupos carbonilos en proteínas mas viejas (Stadman, 1990). El incremento en la oxidación de proteínas puede complicarse con la edad disminuyendo el funcionamiento bioquímico y fisiológico, y puede reflejar daño irreparable de otras macromoléculas celulares como el ADN (Stadman, 1992). Como con los lípidos, la remoción de proteínas oxidadas es un proceso seguido, y es solamente cuando la cantidad en las que son producidas se excede en su remoción o desplazamiento con las nuevas, las moléculas completamente funcionales que lesionan a la célula llegan a ser evidentes

Ácidos nucleicos Los ribonucleótidos así como los desoxirribonucleótidos son blancos sensibles para radicales y especies reactivas de oxígeno (Floyd, 1991). Los sitios moleculares primarios de ataque son las bases heterocíclicas purínicas y pirimídicas. Pero los compuestos ribosil y desoxirribosil son también directos o algunas veces indirectos sitios de reacción. Las reacciones causan modificaciones de las bases heterocíclicas de compuestos desoxirribosil, pero también rompimientos sencillos y dobles de cadena. Muchas de estas lesiones son sin embargo, rápidamente reparadas pero el real potencial genotóxico es aún debatido e inexplorado. Las modificaciones de las bases, incluido la adición de grupos químicos (principalmente OH) y abertura del anillo(s) y rearrreglos moleculares, conducen al cambio en una base única (principalmente guanina/citosina a, adenina/timina) o deleciones de bases en el ADN, algunas de las cuales son reconocidas por ser mutagénicas. Las reacciones de los compuestos (desoxi)ribosil llegan a la degradación oxidativa de la estructura del carbohidrato, seguida de la ruptura de la fosforribosa. Además de este efecto directo en la estructura de los poli(desoxi)ribonucleótidos, el rompimiento de la cadena de ADN podría indirectamente causar muerte celular.

Una hipótesis para explicar la muerte celular después de la exposición a especies reactivas de oxígeno involucra a la enzima poli (ADP-ribosa) polimerasa, la cual es activada siguiendo el daño al ADN mediado por peróxido (Schraufstatter, 1986). Una vez activada la enzima, puede utilizar grandes cantidades de NAD para reparar el daño al ADN por especies reactivas de oxígeno. Cuando se agota el NAD se daña a la célula la capacidad para producir ATP, conduciendo a la deficiencia de energía, cambios en la homeostasis del calcio y acabando con la muerte celular. Aunque este concepto no es el más adecuado para explicar la lesión oxidante, parece claro que los radicales libres pueden destruir vías esenciales para el mantenimiento del estado normal de los

nucleótidos, que son necesarios para el funcionamiento de muchas enzimas, y si no son abiertamente dañados, al menos son más susceptibles a otra lesión (Cerutti, 1985).

Como una consecuencia de la tensión oxidativa intracelular, el incremento en la concentración intracelular de calcio libre puede conducir a la activación de endonucleasas, seguido de la hidrólisis de ácidos nucleicos como parte de la apoptosis (Orrenius, 1988).

El origen más importante de los radicales y/o de las especies reactivas de oxígeno que han sido usadas experimentalmente y son probablemente la causa del daño a los ácidos nucleicos son: radiaciones ionizantes, fotooxidación, efectos locales de productos químicos de especies reactivas alrededor o dentro de los ácidos nucleicos.

Se pensó que el  $O_2$  (el cual causa rompimientos de cadena limitados y modificaciones limitadas de bases) y el  $H_2O_2$  han mostrado modificar las bases heterocíclicas en nucleótidos aislados y ADN, pero el reactivo más común es el  $\cdot OH$ . En este caso la generación de  $\cdot OH$  por reacción con metales iónicos unidos fuera ó muy cercanos a la doble cadena de ADN es considerado el origen más probable. Cada ion metálico puede estar siempre presente unido al ADN ó a proteínas nucleares, pueden ser liberados de almacenamientos celulares por tensión oxidativa ó pueden ser de origen exógeno. Más aún, algunos xenobióticos (por ejemplo, la daunorrubicina, o la bleomicina) pueden intercalarse dentro de la doble cadena como ya se ha visto y también crear complejos con iones metálicos, dentro de la molécula de ADN (Roberfroid, 1995).

#### 1.4.5. Radicales libres y enfermedad

Las enfermedades clínicas asociadas con los radicales libres cada día son más, esto por una parte debido a la capacidad de los radicales libres para inducir estados patológicos que se asemejan a una amplia variedad de enfermedades. Aunque esto implica un proceso oxidativo, solo en muy

pocos casos ha sido bien establecido. Se ha observado que los radicales juegan un papel fundamental en relativamente pocos estados patológicos, pero podrían tener una delicada contribución en muchas otras enfermedades. Las siguientes enfermedades son algunas de las cuales se sabe que los radicales libres causan ó contribuyen a la formación de los procesos patológicos.

### Cáncer

Los mecanismos de carcinogénesis química han sido ampliamente estudiados en modelos animales y estan categorizados dentro de al menos tres categorías: iniciación, promoción y progresión. Para la carcinogénesis humana, el proceso puede ser en apariencia como una serie de eventos (incluyendo los tres estados identificados en animales):

- \* Exposición al agente

- \* Metabolización del agente

- \* Interacción entre el agente y la célula (especialmente ADN) - iniciación

- \* Reparación del daño al ADN, muerte de la célula ó persistencia y replicación de células anormales dentro del tejido

- \* Crecimiento de las células anormales (célula pre-neoplásicas) - promoción

- \* Crecimiento de el tumor y es extendido a otras partes del cuerpo - progresión

La iniciación es un proceso irreversible y se realiza cada que carcinogenos endógenos o exógenos alteran el ADN, la potencia de estos carcinógenos parece estar determinada por la estabilidad de aductos formados con el ADN y por su capacidad de inducir alteraciones heredables en los genes blancos. Entre estos carcinógenos, existen evidencias experimentales de que las especies reactivas de oxígeno tienen un papel importante en la iniciación, promoción y progresión de tumores. Estas especies son mutagénicas en células de mamíferos in vitro, y también son

responsables de la transformación celular. Se han identificado algunas mutaciones específicas, y está bien establecido que las especies reactivas de oxígeno pueden alterar la actividad de las cinasas y una variedad de genes (Harris, 1992). Además, como se ha mencionado, del rompimiento del ADN inducido por poli(ADP)ribosa de proteínas cromosómicas

Existen hipótesis que indican que las modificaciones del ADN mediante especies reactivas de oxígeno pueden afectar regiones específicas del ADN y ser responsables de activación de oncogenes y/o de la inactivación de antioncogenes. Hay evidencias que respaldan esta hipótesis, que incluyen datos que muestran que 8-hidoxi-2'-deoxiguanosina puede causar descodificación (Frenkel, 1989) y generar exógenamente especies reactivas de oxígeno induciendo la expresión de algunos oncogenes (Fig.9) (Cerutti, 1993).

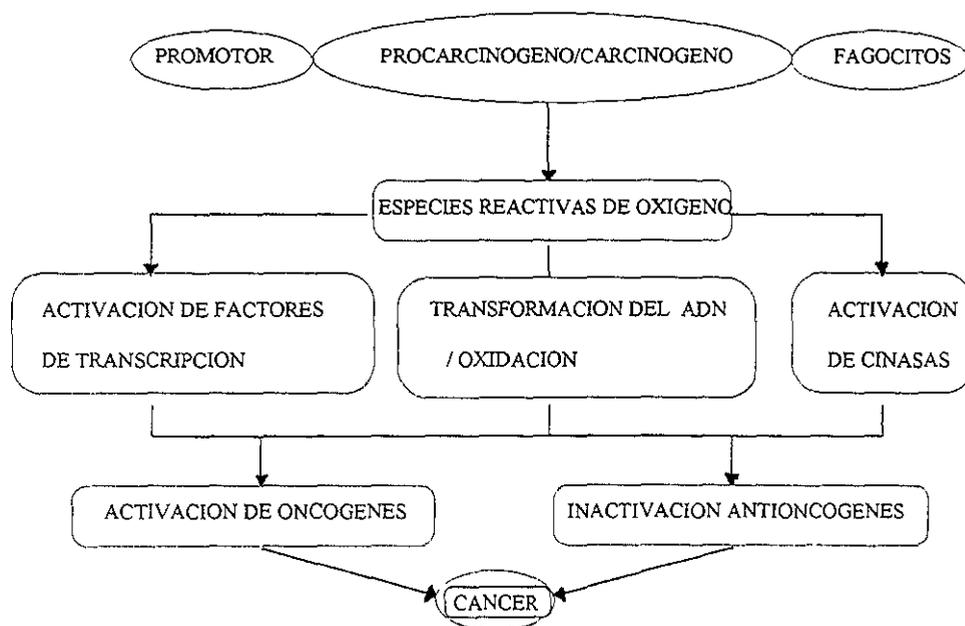


Fig 9 Las especies reactivas de oxígeno tienen un papel importante en el desarrollo de cáncer (Balz frei, 1994)

Los radicales de oxígeno y especies relacionadas podrían también estar involucradas en la promoción. Un grupo bien estudiado en la promoción de tumores son los esteres de forbol, no solamente pueden producir cambios en la expresión genética causando además la adopción de cambios de las características fenotípicas de células tumorales, pero también pueden causar inflamación para liberar superóxido. El papel de las células inflamatorias en el combate con el desarrollo de tumores es paradójico, ya que se ha observado que la inflamación puede contribuir a la promoción de tumores. La liberación de superóxido por células fagocíticas seguida de la estimulación de esteres de forbol es proporcional a su actividad promotora (Burdon, 1993; Cerutti, 1993).

#### b) Otras enfermedades

Existen otras enfermedades relacionadas a los radicales libres, como lo son las cardiovasculares, y de particular interés las asociadas con las lipoproteínas de baja densidad (LDL), las cuales han sido asociadas a la arterioesclerosis. En el sistema inmune, la inflamación, es un proceso por el cual se producen la mayoría de las especies reactivas de oxígeno de origen fagocitario. En cuanto a los desordenes neurológicos, se han relacionado varios tipos de enfermedades con radicales libres como lo son la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson, entre otras. Enfermedades pulmonares, como la fibrosis, también han sido relacionadas a radicales, y en particular a la toxicidad del oxígeno molecular como una base de radical libre (Freeman, 1982)

## 1.5. Antioxidantes

Un antioxidante es una molécula que detiene una reacción oxidativa a través de diversos mecanismos. Las especies reactivas de oxígeno como se ha visto, están implicadas en la patogénesis de ciertas enfermedades humanas. Estas especies son generadas en sistemas biológicos a través de procesos patológicos o fisiológicos endógenos. Así como de origen exógeno como componentes de los alimentos, fármacos, luz ultravioleta, radiaciones ionizantes y contaminación.

Los antioxidantes pueden actuar a diferentes niveles en el proceso oxidativo, por ejemplo. atrapadores iniciales de radicales, unión a iones metálicos, atrapadores de radicales peroxil, ó remoción de moléculas dañadas oxidativamente y otros tipos de acciones (Blaz Frei, 1994).

Basada en la variedad de antioxidantes biológicos, estos se pueden clasificar en antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos. Los primeros están ejemplificados por superóxido dismutasa o enzimas similares y los segundos por vitaminas y micronutrientes (flavonoides, lizaroides) y otros compuestos antioxidantes de bajo peso molecular, por ejemplo, glutatión (GSH), ubiquinol (Negri, 1991).

### 1.5.1. Sistemas antioxidantes enzimáticos

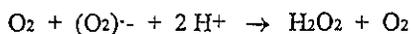
Los organismos aeróbicos están protegidos contra el daño oxidativo inducido por radicales libres. Las funciones y acciones de las defensas antioxidantes han sido estudiadas *in vivo* e *in vitro*. La tabla 2 resume las enzimas que reducen hidroperóxidos y peróxido de hidrógeno. Glutatión peroxidasa, glutatión-S-transferasa, glutatión hidroperóxido fosfolípido peroxidasa (PHGPX) y peroxidasa son conocidos por descomponer hidroperóxidos de lípidos a alcoholes correspondientes. PHGPX es el único que puede reducir hidroperóxidos y fosfolípidos integrados dentro de las biomembranas. Glutatión peroxidasa, peroxidasa y catalasa reducen peróxido de hidrógeno a agua. (Niki, E. 1993).

Enzimas	Función
Glutación peroxidasa	Reducción de hidroperóxidos de ácidos grasos y peróxido de hidrógeno $LOOH + 2GSH \rightarrow LOH + H_2O + GSSG$ $H_2O_2 + 2GSH \rightarrow 2 H_2O + GSSG$
Glutación-s-transferasa	Reducción de hidroperóxidos de ácidos grasos
Glutación hidroperóxido fosfolípido peroxidasa	Reducción de hidroperóxidos de fosfolípidos $PLOOH + 2GSH \rightarrow PLOH + H_2O + GSSG$
Peroxidasa	Reducción de hidroperóxidos de ácidos grasos y peróxido de hidrógeno $H_2O_2 + AH_2 \rightarrow 2 H_2O + A$
Catalasa	Reducción de peróxido de hidrógeno $2 H_2O_2 \rightarrow 2 H_2O + O_2$

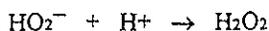
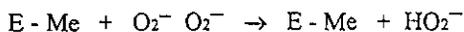
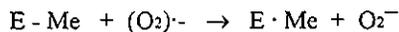
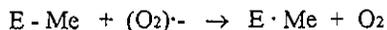
Tabla 2. Descomposición de hidroperóxidos y peróxido de hidrógeno por enzimas (Niki, 1993).

a. Superóxido dismutasa (SOD).

En células eucariotas dos tipos de SOD han sido descritas: la enzima Cu-Zn localizada en el citosol y la enzima Mn principalmente en mitocondria, ambas enzimas catalizan la reacción de dismutación con la misma eficiencia:



El mecanismo propuesto para la catalisis enzimática por SOD es el siguiente:



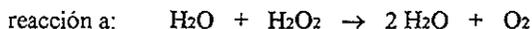
Los efectos benéficos de SOD en la inhibición de esteres de forbol, mediante la producción de radicales de oxígeno por células inflamatorias han sido demostrado, probando que la administración exógena de SOD destruye al anión superóxido atacandolo de una manera catalítica (Roberfroid, 1995).

#### b. Catalasa

El peróxido de hidrógeno es una molécula estable, y puede difundir atravezando membranas biológicas; es producido por reducción divalente de oxígeno molecular o por dismutación del anión superóxido.

La catalasa es una enzima localizada ampliamente en los peroxisomas, protege a las células de la acumulación de  $H_2O_2$  (reacciones a y b), por dismutación para formar  $H_2O + O_2$ , ó usado como un oxidante cuando trabaja como una peroxidasa. La reacción catalítica usa dos moléculas de peróxido de hidrógeno fuera de la utilización de otra clase de sustratos.

Dos modos de acción han sido descritos para la actividad de la catalasa:



Acción de la catalasa como una dismutasa



Acción de la catalasa como una peroxidasa

$R$ , actua como un sustrato para ser oxidado

La catalasa ha sido utilizada para tratar procesos en los cuales el peróxido de hidrógeno ha sido involucrado como en la lesión inflamatoria y xeroderma pigmentosun, en personas con este padecimiento, ungüentos con catalasa bovina en la piel mostraron estabilizar el desarrollo de tumores (Roberfroid, 1995).

## 1.5.2. Sistemas antioxidantes no enzimáticos

Los antioxidantes más prominentes, presentes naturalmente en los alimentos son el ácido ascórbico (vitamina C), los tocoferoles (incluyendo a la vitamina E), flavonoides, carotenoides y glutatión. Estos antioxidantes naturales protegen básicamente por la intercepción de radicales libres

### 1.5.2.1. Vitamina C

El ácido ascórbico es requerido *in vivo* como un cofactor para la actividad enzimática; está presente en la mayoría de los fluidos corporales como ascorbato, la donación de un electrón de este produce un radical semidehidroascorbato:

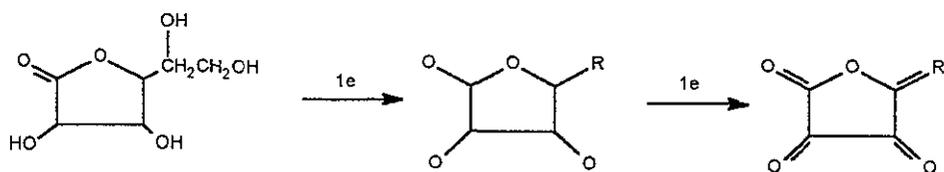


Fig 10. Radical semidehidroascorbato (Roberfroid, 1995)

Más probablemente de esta manera el ascorbato en la dieta inhibe la acción carcinogénica de diversos compuestos nitrosos bloqueando las reacciones de nitración, además previene *in vivo* la formación de N-nitrosaminas.

El ascorbato es solamente el antioxidante exógeno en plasma que puede completamente proteger contra el daño peroxidativo inducido por radicales peroxil acuosos y los oxidantes liberados de neutrófilos activos

El ácido ascórbico regenera a la vitamina E, manteniendo constante los niveles en los valores séricos. Cuando el ácido ascórbico es consumido, no es posible la regeneración de vitamina E y se observa una disminución en las concentraciones.

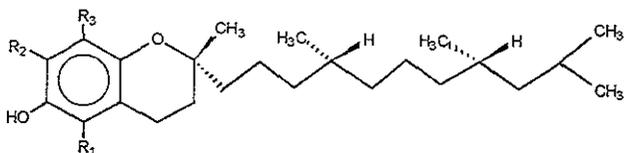
El fuerte potencial reductor hace a la vitamina C como un eficiente atrapador de radicales libres. En presencia del  $\alpha$ -tocoferol, el ascorbato actúa como un antioxidante excelente cuando la peroxidación de lípidos en LDL es iniciada (Retsky, 1993).

El estudio de los efectos de la vitamina C en la genotoxicidad de los radicales libres en células CHO, cuando son expuestas a sistemas enzimáticos generadores de radicales de oxígeno (xantina oxidasa/hipoxantina), desarrolla un aumento en el número de intercambio de cromátidas hermanas (ICH), con la inclusión de vitamina C se desarrolla un efecto protector y produce una *disminución de intercambios* (Weitberg, 1985).

Existen evidencias que indican que la ingesta alta de vitamina C en la dieta disminuye el riesgo de cáncer de estómago y posiblemente el riesgo en cánceres de boca, faringe, esófago, pulmón, páncreas y cervix (FNPC, 1997).

#### 1.5.2.2. Vitamina E

La vitamina E, es el nombre genérico de una familia homogénea de compuestos que tienen compuestos de hidroquinona metilada y una cadena isoprenoide (Fig 11), el  $\alpha$ -tocoferol, un componente mayor de la vitamina E, es bien conocido por representar la continua posibilidad de prevenir la peroxidación de membrana por atrapar los radicales  $LOO\cdot$  involucrados en la peroxidación en cadena.



Clase de tocoferol	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>
α	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>
β	CH <sub>3</sub>	H	CH <sub>3</sub>
γ	H	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>
δ	H	H	CH <sub>3</sub>

Fig. 11. Estructura de la vitamina E (Roberfroid, 1995)

La vitamina E actúa como un antioxidante por atrapar radicales libres, los cuales pueden directa o indirectamente iniciar ( $O_2$ ,  $O_2^{\cdot-}$ ,  $HO^{\cdot}$ , etc.) o propagar la oxidación de lípidos. La vitamina E tiene un grupo fenólico OH responsable de la actividad oxidante y una cadena fitil a lado ( $C_{16}H_{33}$ ) la cual favorece la inserción dentro de la región de la bicapa de lípidos. In vivo, la vitamina E extingue al oxígeno y también reacciona con el radical superóxido. La reactividad química difiere considerablemente entre los tocoferoles, en la secuencia de  $\alpha$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ , y  $\beta$  - tocoferol. Los principales productos de oxidación son quinonas para todos los homólogos y epóxidos de quinona. Pero es más importante el hecho de que la vitamina E puede reaccionar con radicales peroxil de lípidos para formar radicales de vitamina E, los cuales son insuficientemente reactivos para extraer el  $H^{\cdot}$  de los grupos metilados de los compuestos acil de las grasas insaturadas de fosfolípidos de membrana. Los radicales de vitamina E producidos son estables, porque el electrón impar en el átomo de oxígeno puede ser deslocalizado dentro de la estructura del anillo aromático (Fig. 12)

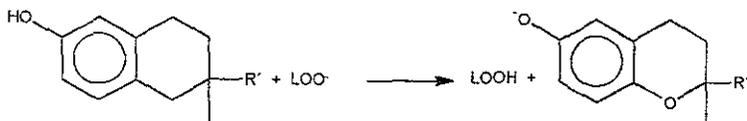
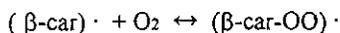
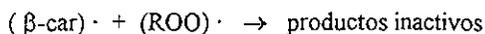


Fig. 12. Radicales de vitamina E (Roberfroid, 1995)

### 1.5.2.3. Carotenoides

Históricamente, el  $\beta$ - caroteno ha sido referido como pro-vitamina A porqué es capaz de ser metabolizado a vitamina A. El  $\beta$  caroteno está adherido oxidativamente a dos formas de moléculas de retinaldehído, una menor fracción la cual irreversiblemente se oxida a ácido retinoico, la cantidad que queda es reducida a retinol (Roberfroid, 1995).

La protección de los carotenoides en las células y tejidos, es explicado en base a la actividad extinguidora de oxígeno. Más específicamente, las acciones antineoplásicas de carotenoides en cultivos celulares, protección contra carcinógenos y promotores de tumores en animales, y potencialmente de  $\beta$ -caroteno como un agente quimiopreventivo puede ser explicado en términos de reactividad química. Los carotenoides reaccionan con  $O_2$  resultando en un carotenoide y dioxígeno triple ( $3 O_2$ ). En la presencia de radicales peroxil, el  $\beta$ -caroteno produce un radical carbón carotenil ( $\beta\text{-car} \cdot$ ) el cual en la ausencia de oxígeno, es un eficiente terminador de cadena oxidativa.



La presencia de oxígeno, sin embargo, continúa la propagación de la cadena. Esto es por las reacciones reversibles del radical carotenil con oxígeno para formar una especie de propagación de a cadena (Sies, 1993, Roberfroid, 1995)

Las funciones biológicas del  $\beta$ -caroteno podrían ser resumidas como sigue: previene el daño fotosensitivo en bacterias, animales y humanos, disminuye el número de ICH y transformaciones malignas en cultivos celulares, inhibe la inducción de tumores en roedores por luz UV y químicamente, disminuye las lesiones premalignas en humanos y modifica la respuesta inmune (Krinski, 1991).

#### 1.5.2.4. Glutación

El glutación es un importante antioxidante soluble en agua y agente reductor, sintetizado de glutamato, cisteína y glicina en muchos tipos celulares y presente intracelularmente en concentraciones milimolares. Actúa como un sustrato o cosustrato en numerosas reacciones enzimáticas, por ejemplo, la glutación-s-transferasa o reacciones de glutación peroxidasa. Glutación como tal no es requerido en la dieta de los animales. De hecho, el glutación de la dieta es pobremente absorbido por los humanos (Witschi, 1992).

Glutación es un sustrato para la reducción de hidroperóxido en la enzima glutación peroxidasa, su ausencia puede conducir a la acumulación de hidroperóxidos de lípidos. El glutación también reacciona directamente con radicales libres y puede proteger a las células de oxígeno, radicales hidroxil y superóxido. Durante estas reacciones la oxidación de glutación (GSSG) es formada y puede ser reducida a GSH por la enzima glutación disulfito reductasa dependiente de NADPH (Balz Frei, 1994)

El glutación tiene un papel importante en la inactivación de un gran número de fármacos y en los procesos metabólicos de ciertos compuestos endógenos, como estrógenos, prostaglandinas y leucotrienos.

#### 1.5.2.5. Lazaroides

El 21-aminoesteroide (lazaroides) son una serie de nuevos compuestos no glucocorticoides desarrollados para el tratamiento del sistema nervioso central, lesiones originadas de trauma o parálisis. La base para el desarrollo de estos compuestos fue que ellos se localizan específicamente en los dominios hidrofóbicos de membranas celulares e inhiben la peroxidación. Los lazaroides inducen cambios en la permeabilidad de la membrana y también se ha demostrado que son poderosos inhibidores de peroxidación de lípidos dependiente de hierro, así como atrapar radicales alquil peroxi ( $\text{LOO}\cdot$ ) y fenoxil ( $\text{PhO}\cdot$ ) (Roberfroid, 19995).

#### 1.5.2.6. Ubiquinonas

Las ubiquinonas son benzoquinonas liposolubles que actúan como coenzimas, también llamadas coenzima Q, con una extremidad isopropenoide. Las formas reducidas de las ubiquinonas, los ubiquinol, son antioxidantes más eficientes que los análogos oxidados. La forma predominante de estos compuestos es la ubiquinona-10. El papel que tienen es como acarreadores redox en la cadena respiratoria, actuando como mediador entre la deshidrogenasa y citocromos de la cadena de transporte de electrones mitocondrial y participa en la transferencia de protones a través de membrana mitocondrial interior.

El  $\text{O}_2$  principalmente interactúa con el isopropenoide a lado de la cadena de la ubiquinona-10, mientras que el ubiquinol-3 reacciona con radicales peroxil lipídicos, una molécula de ubiquinol-3 puede atrapar dos moléculas de radicales peroxil (Landi, 1992). La diferencia en la potencia de antioxidantes de homólogos de ubiquinol en membrana resultan de las diferencias en la posición de la membrana y de la capacidad de reducir ubiquinonas a ubiquinol (Ulrich, 1985)

### 1.5.2.7. Flavonoides

Los flavonoides son un extenso grupo de compuestos polifenólicos que se encuentran ampliamente distribuidos en las plantas vasculares. Su estructura incluye dos anillos de benceno unidos por un anillo pirano heterocíclico. Se conocen unos 2000 flavonoides localizados entre los alimentos consumidos por el humano como las frutas, vegetales, té, raíces y tubérculos, tanto libres como en glicósidos; estos últimos se constituyen para darle color a las hojas, flores y frutos (Bruneton, 1986; Balz Frei, 1994). Estos compuestos protegen a las frutas y a los vegetales del daño de fotooxidación causado por el oxígeno, de ahí que especialmente altas concentraciones de flavonoides existan en las cáscaras y hojas.

Las clases de flavonoides incluyen flavonas, flavononas, flavonoles, chalconas, catequinas, etc (Fig. 13). Los flavonoides presentan todos los matices de solubilidad, desde totalmente solubles en agua hasta insolubles. Por ejemplo, las flavonas y los flavonoles son poco solubles en agua, en tanto que los hidroflavonoles sí.

Los flavonoides son metabolizados por la microflora del intestino, y los principales metabolitos comúnmente son compuestos fenólicos (Barz, 1975). Después de la absorción, los flavonoides son conjugados en el hígado; los compuestos específicos dependen del tipo de flavonoide y las especies animales, y son excretados en orina y bilis.

Los flavonoides son conocidos por tener numerosos efectos biológicos de significancia farmacológica. Rutina y hesperitina, dos de estos compuestos han sido llamados vitamina P, ó factores de permeabilidad; ellos son usados en el tratamiento de varias condiciones características de la capilaridad sanguínea e incremento en la fragilidad capilar. Quercetina y rutina pueden disminuir los niveles de triglicéridos séricos y son agentes antitrombóticos.

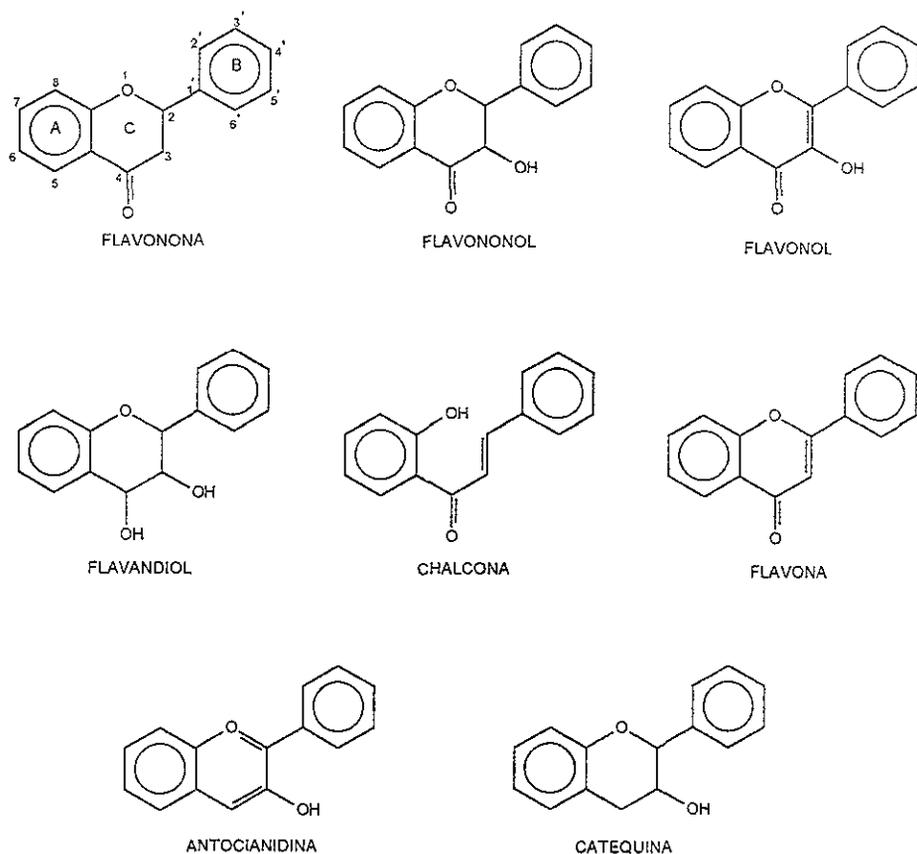


Fig 13. Estructuras de flavonoides (Dominguez, 1973)

Algunos flavonoides muestran efectos antialérgicos, antiinflamatorios, y efectos anticarcinogénicos. También han sido capaces de actuar en varias funciones biológicas como la inhibición en la actividad de las enzimas, receptores y transportadores (Roberfroid, 1995; Herrman, 1976).

Recientemente los flavonoides han sido propuestos para actuar como antioxidantes, más probablemente por su capacidad para atrapar radicales. Para los flavonoides, las siguientes características estructurales pueden ser responsables para una función antioxidante óptima

- a. El grupo catecol en el anillo B confiere alta estabilidad en los radicales aroxil,
- b. La deslocalización extensiva del electrón es asegurada por conjugación de el anillo B a la estructura 4-oxo vía un doble enlace 2-3.

Las diferentes propiedades antioxidantes que tienen los flavonoides dependen también de el grado de hidroxilación de los anillos de benceno. Concerniente como atrapadores de  $O_2^-$ , los grupos hidroxil en el anillo B son esenciales para la actividad, así como también la presencia de un hidroxil en el C-3, aumenta la habilidad de atrapamiento de los flavonoides. Algunos flavonoides como quercetina, miricetina, naringina y kamferol han demostrado ser fuertes atrapadores de radicales de oxígeno, pero rutina se ha encontrado ser cuatro veces más efectiva que los antes mencionados (Herrman, 1976).

Además de atrapar radicales superóxido, estos compuestos también son capaces de capturar radicales  $HO \cdot$ ,  $ROO \cdot$ ,  $NO \cdot$ ; vía el mecanismo de la transferencia de un electrón. Alternativamente los flavonoides pueden actuar como antioxidantes por medio de sus propiedades como queladores de metales (Cu, Fe, Zn) (Metodiewa, 1997). Los flavonoides inhiben la formación de malonaldehído (MDA) producto de la oxidación de lípidos insaturados, el cual se considera como formador de radicales hidroxil (Robak, 1988) Así también se sugiere que la estructura orto-hidroxi de los polifenoles es esencial para la actividad protectora contra el peróxido de hidrógeno (Nakayama, 1992).

Una serie de investigaciones demostraron que los flavonoles en particular pueden estabilizar el ácido ascórbico, especialmente en la presencia de metales pesados, como el cobre, el cual puede destruir rápidamente el ácido ascórbico (Herrman, 1976)

Los flavonoides también son efectivos en prevenir la peroxidación de lípidos. Por ejemplo, los flavonoides polifenólicos inhiben la peroxidación de LDL y su subsecuente toxicidad. El

mecanismo celular involucrado en la protección por flavonoides de la oxidación de LDL no es conocida, pero cada mecanismo puede ser relacionado a lo siguiente (Balz Frei, 1994 ,Roberfroid, 1995):

- a. Sus propiedades antioxidantes (por deficiencia de vitamina E o por regeneración de vitamina E),
- b. Su actividad inhibitoria hacia lipooxigenasa,
- c. La inhibición de enzimas celulares involucradas en señales de transducción
- d. Atrapamiento de radicales que inician la peroxidación de lípidos como HO<sup>·</sup>, O<sub>2</sub><sup>-·</sup>, O<sub>2</sub> y Fe(OH)<sub>3</sub>
- e. Unión a metales iónicos
- f. Atrapamiento de radicales peroxil de lípidos

Se ha tratado de explicar también que su actividad es debido a la acción de los polifenoles actuando como donadores de H a los radicales peroxil implicando la terminación de las reacciones en cadena de radicales en adición al posible atrapamiento de especies activas de oxígeno a el estado de iniciación (Sanz, 1994).

Ejemplos de atrapadores de radicales peroxil lipídicos son la quercetina, morin, fisetina, etc , que atrapan el radical peroxil del ácido linoléico; también son potentes inhibidores de la modificación de LDL por macrófagos. Los flavonoides protegen de la disminución de  $\alpha$ -tocoferol retrasa el ataque de lipoperoxidación de lípidos detectable en LDL.

Varios sistemas de enzimas como NADPH oxidasa, lipooxigenasa (LOX), ciclooxigenasa (COX), mieloperoxidasa (MPO) y xantina oxidasa (XO), responsables de la producción de radicales libres, son inhibidas por flavonoides, por ejemplo quercetina es efectivo en inhibir LOX, así como rutina, luteolina, hesperitina y quercetina inhiben la actividad de MPO en neutrófilos. Un

estudio que relaciona la estructura con la actividad de inhibidores de xantina oxidasa y como atrapadores de radicales superóxido, encontraron que grupos hidroxil en C-5 y C-7 y el doble enlace entre C-2 y C-3 fueron esenciales para una actividad inhibitoria alta en XO, para una alta actividad atrapadora de superóxido de otra manera, un grupo hidroxil en C-3' en el anillo B y el C-3 fueron primordiales. Las flavononas, dihidroflavonoles y flavonoles no fueron capaces de inhibir XO, pero sí fueron considerados como atrapadores de superóxido. Siendo los flavonoides más efectivos para ambas acciones quercetina, fisetina, miricetina y rutina (Cos, 1998).

Varios aspectos en la actividad biológica de los flavonoides han recibido interés enfocado en la capacidad de modular la actividad del citocromo P-450 (cit P-450) Se ha encontrado que la quercetina es un potente inhibidor de la actividad del cit P-450. En general flavonoides que poseen grupos hidroxil inhiben la actividad del cit P-450, mientras que flavonoides con escasos grupos hidroxil pueden actuar para estimular la actividad del cit P- 450 directamente

Los flavonoides inhiben reacciones de hidroxilación catalizadas , interfiriendo con la unión a sustratos Se observó, que probablemente quercetina actúa en el complejo P-450-Fe III-anión peróxido y/o un paso más allá. También se ha considerado la posibilidad de que quercetina podría ser un sustrato para P-450, es decir actuar como un pseudosustrato y que la reducción de quercetina a la semiquinona o quinona podría causar la destrucción reductiva de el complejo hemo-oxo, así previniendo la hidroxilación de sustratos. La quercetina no muestra inhibición selectiva de isoenzimas (Sousa, 1985).

### Flavonoides y cáncer

*In vitro*, quercetina y otros flavonoides han sido encontrados por ser mutagénicos en la prueba de Ames. De otra manera, ha demostrado inhibir el crecimiento de ciertas células leucémicas *in vitro*. De los ensayos de Ames encontrados positivos, se sospecho que quercetina tuviera potencial

carcinógeno, seguido de exámenes de carcinogenicidad, solamente uno de diversos estudios mostró un efecto carcinogénico (Ames, 1993).

Varios experimentos en animales han demostrado que quercetina y silimarín, cuando se aplican tópicamente, inhiben la fase de promoción en modelos de cáncer de piel (Nishino, 1984; Zi, 1997). Así también; se ha observado disminución en tumores de colon, tumores intestinales y de vejiga. Un estudio posterior mostró que quercetina, robinetina y miricetina disminuyeron tumores en pulmón inducido por diol-2-epóxido, pero no en aquellos inducidos por benzo(a)pireno.

Algunos flavonoides han mostrado inducir funciones mezcladas en la actividad de las oxidasas, el cual, puede impedir o aumentar la carcinogénesis dependiendo del carcinógeno involucrado. Algunos estudios experimentales demostraron que flavonoides metoxilados, incluyendo tangerina y nobitelina inducen la actividad de benzo(a)pireno hidrolasa, una enzima que puede inhibir tumores inducidos por benzo(a)pireno. De otra manera, flavonoides polihidroxilados, como kaempferol y miricetina han mostrado inhibir la actividad de ésta enzima. Se observó que quercetina inhibe la actividad de diversos carcinógenos y promotores de tumores así como también, interactuar con carcinógenos específicos en el tracto gastrointestinal, además reduciendo su biodisponibilidad (Zi, 1997).

En ratones tratados con quercetina a dosis de 100-1000 mg/Kg se incrementaron significativamente las frecuencias de micronucleos en eritrocitos de médula ósea, así como galangina; sin embargo, hesperitina y neohesperidina dihidrochalcona a las mismas dosis no incrementaron la frecuencia. En conejos a dosis de 250, 500 y 1000 mg/Kg quercetina no mostró incremento de ICH en linfocitos de sangre periférica de uno a siete días de tratamiento (MacGregor, 1983).

Diversos estudios de carcinogenicidad en la dieta se han llevado a cabo con quercetina, kaempferol y rutina, siendo los resultados predominantemente negativos

Existen investigaciones en donde se estudiaron extractos acuosos de té verde (TWE), té de polifenoles (TP), y té de catequinas (EGCG). Todas las muestras mostraron efectos inhibitorios significativos al exponerse con mitomicina en células V79, indicando por diferentes análisis que estos té son efectivos en la inhibición de las tres fases de la carcinogénesis (Han, 1997) Se ha inferido un mecanismo usando un modelo molecular demostrando que los ingredientes del té verde inhiben la urocinas, un enzima crucial para el crecimiento del cáncer (Jankun, 1997).

También se ha demostrado que los efectos inhibitorios de preparaciones de té contra la formación y crecimiento de tumores es debido a los efectos antioxidantes y un posible efecto antiproliferativo, suprimiendo la activación carcinogénesis y atrapando agentes genotóxicos

El té verde que contiene polifenoles, los cuales incluyen a los flavonoles, flavandioles, flavonoides y ácidos fenolicos, constituyen por arriba del 30% del peso seco de las plantas . Los flavonoles son facilmente oxidados a la correspondiente o-quinona; estos pueden funcionar como aceptores y donadores de hidrógeno. En la estructura del flavonol, el grupo 5 y 7 dihidroxi y el 1-oxígeno hacen a los carbonos en posición 6 y 8 fuertemente nucleofílicos. Los té también tienen una alta actividad de complejación a los metales (Yang, 1993, 1997)

En cultivos celulares las frecuencias de ICH y aberraciones cromosómicas inducidas por mitomicina y luz UV fueron eliminadas por un subsecuente tratamiento con té de polifenoles en la presencia de la fracción S9. En ausencia de la fracción, sin embargo, los extractos del té disminuyeron los ICH y las aberraciones cromosómicas a bajas concentraciones, pero aumentaron a altas concentraciones. El té verde con negro y el té de polifenoles administrados oralmente a 6, 2, o 18 horas antes de la inyección intraperitoneal de mitomicina resultó en una disminución

significativa de micronucleos de médula ósea de ratón. Estudios recientes reportaron que el consumo de té verde inhibe la formación de micronucleos en linfocitos de sangre periférica de fumadores (Yang, 1993).

En resumen los tés poseen actividad antioxidante por tres diferentes mecanismos: 1) Por la presencia de la estructura del catecol, la mayoría de los tés son fuertes queladores de metales pesados. Los polifenoles pueden unirse a ellos y además disminuir los niveles de iones ferrico y ferroso los cuales son requeridos para la generación de radicales reactivos de oxígeno por las reacciones de Fenton y Haber-Weiss; 2) Los tés de polifenoles son fuertes atrapadores de anión superóxido y radicales hidroxil, moléculas que pueden dañar al ADN; 3) Los tés de flavonoides pueden reaccionar con radicales peroxi y además terminar la cadena de peroxidación de lípidos.

Las especies reactivas de oxígeno juegan un papel importante en la carcinogénesis a través del daño al ADN, alterando la expresión genética o afectando el crecimiento y diferenciación celular.

## 1.6. Gordolobo (*Gnaphalium oxyphyllum*)

Son varias las especies de *Gnaphalium* que se conocen en México con el nombre de Gordolobo. *Gnaphalium* L. es un género cosmopolita de más de 230 especies de la familia de las compuestas. México cuenta con alrededor de 35 de ellas *Gnaphalium oxyphyllum* es la especie junto con otras, que llega comunmente a los mercados de la Ciudad de México para su consumo. Las características particulares de esta planta son las siguientes (Aguilar, 1996).

**Habitat:** Planta silvestre que crece en terrenos de cultivo, de riego y temporal y abandonados. Asociada a vegetación perturbada de bosques tropicales caducifolio, subcaducifolio, subperennifolio y perennifolio, matorral xerófilo, bosque espinoso, bosque mesófilo de montaña, bosques de encino y pino.

**Distribución geográfica:** Es una especie muy variable que se conoce desde el sur de los Estados Unidos de América hasta Guatemala. En el valle de México pueden reconocerse dos variedades, la *oxyphyllum* y la variedad *nataliae*.

**Identificación.** Hierba anual o perene, aromática y granulosa, de 30 a 200 cm. de altura, tallo simple o profusamente ramificado cubierto de vellitos que le dan una apariencia blanca, densa a medianamente hojosa. Las flores son angostas de color blanco o crema y aparecen en cabezuelas. Los frutos son pequeños y las semillas tienen un penacho en la punta.

**Usos:** Se emplea en infusión para combatir afecciones respiratorias, calman la tos, ayudan a la expectoración, infecciones en la garganta, bronquitis y asma. El mucilago que contiene probablemente justifique las propiedades emolientes y pectorales que se le atribuyen. En trastornos gástricos interviene en el tratamiento de las úlceras, dolor de estómago y parásitos intestinales. Por otro lado interviene en la terapéutica del cáncer, heridas, fiebre, hidropesía, ciática y lumbago. Se dice también que favorece a la circulación, combatiendo así hemorroides y várices.

La Sociedad Farmacéutica Mexicana la describe como antirreumático y emoliente.

Desafortunadamente no se han detectado estudios experimentales que corroboren su efectividad.

Un análisis fitoquímico preliminar de *Gnaphalium oxyphyllum* reporta lo siguiente (Berdeja.

1996).

<u>Extracto Acuoso</u>	<u>Extracto Etanólico</u>	<u>Extracto Clorofórmico</u>
Alcaloides	Flavonoides	Alcaloides
Flavonoides	Taninos	Azúcares
Taninos	Antraquinonas	Taninos
Antraquinonas	Azúcares	Antraquinonas
Quinonas		Coumarinas

En diversas especies de *Gnaphalium* se han encontrado muchos y variados compuestos flavonoides, estos compuestos como se ha visto, presentan varias funciones biológicas. Entre las especies de *Gnaphalium* se realizó una revisión de estudios experimentales con flavonoides encontrándose que la especie *spicatum* mostró tener efectos antimicrobianos en extractos metanólicos de la planta (Mongelli, 1995). Efectos similares se observaron en *G. robustum* en donde se aisló la flavona 8-o-(2-metil-2-buteonil-5,7-dihidroxi-3-metoxiflavona (Cuadra, 1994) Caceres, A. (1990) usó *G. stramineum* para el tratamiento de desordenes gastrointestinales, específicamente para enterobacterias. Así también, se aislaron tres flavonas metoxiladas, que exhibieron propiedades antimicrobianas, en extractos etéreos (Torrenegra, 1989) y *G. viscosum* mostró también actividad antibacterial (Caceres, 1991).

De *G. affine* se aislaron los flavonoides 4,2',4'-trihidroxi-6-metoxichalcona-4-o-beta-glicosido, quercetina, luteolina, las cuales mostraron efectos inhibitorios en conejo de agregación plaquetaria y de la enzima reductasa aldolasa en bovino (Tachibana, 1995) Kubo, I.(1995) en compuestos fenólicos flavonoides encontrados en *Gnaphalium cheiranthifolium* demostró que tenían actividad inhibitoria de tirosinasas.

De *Gnaphalium indicum* se aisló un potente promotor antitumoral el flavonoide 5,7,3',4'-tetrahidroxi-3-metoxiflavona. Esta planta medicinal mexicana inhibe esteroides de forbol un promotor tumoral que aumenta la síntesis de fosfolípidos y la actividad en el transporte de azúcares en cultivos celulares. Luteolina y quercetina dos flavonoides encontrados en esta planta también tuvieron actividad promotora antitumoral *in vivo* como *in vitro* (Asaka, 1992).

Así también se han encontrado diversos flavonoides en las plantas de *Gnaphalium*; por ejemplo de *G. gaudichaudianum* se aisló el 5,8-dihidroxi-6,7-dimetoxiflavona (Horie, 1995); 5,7-dihidroxi-3,8-dimetoxiflavona; 5,7-dihidroxi-3-metoxiflavona; 3-metoxiquercetina (Torrenegra, 1989), de *G. viravira* se obtuvo quercetina (Latorre, 1990). de *G. obtusifolium* se encontró el flavonoide el 3,5,7-trihidroxi-6,8-dimetoxiflavona (Ohlendorf, 1971), de *G. pellitum* se aislaron los flavonoides 5-hidroxi-7,8-dimetoxiflavona y, 7-metoxiquercetina (Torrenegra, 1978).

Finalmente, en todas las especies de *Gnaphalium* se han encontrado flavonoides como galangina, gnafalina, rutina, quercetina, 8-metoxigalangina, y compuestos galangina hidroxilados (Wollenweber, 1992).

## 1.7. Pruebas para la identificación de agentes mutagénicos

Existe una clasificación general de ensayos de la toxicología genética, donde se incluyen a los exámenes en clases similares; han sido definidos cuatro grupos. dos grupos de exámenes determinan los cambios genéticos en la forma de mutaciones específicas de un gen o locus. Un tercer grupo, es un examen primario de daño al ADN, típicamente determina la inducción de aductos de ADN o fracturas y la respuesta celular producida durante la reparación de este daño; esta respuesta incluye la estimulación de la reparación del ADN, recombinación somática entre homólogos o cromátidas hermanas, y fracturas de la cadena de ADN. Un cuarto grupo no directamente identifica daño al ADN, pero evalúa la capacidad de una sustancia examinada para transformar células “normales” a células con propiedades neoplásicas. Ha sido asumido, que alteraciones en el ADN son parte de los procesos de transformación de las células y más recientemente el análisis de activación mutacional de transformación de oncogenes, como el gen ras. Exámenes de daño primario a ADN son usados predominantemente como una medida de el potencial oncogénico y no es asociado con la producción de daño genético transmisible (Brusick, 1987).

Los estudios para detectar mutaciones generalmente se realizan con pruebas en microorganismos (bacterias, levaduras, etc), esto es debido a la relativa simplicidad con que puede detectarse el cambio de un gen provocado por un agente específico. Estos estudios están representados principalmente por el ensayo de Ames en *Salmonella typhimurium*, este examen es ampliamente usado y validado, referido como el ensayo *in vitro* primario para la detección de carcinógenos y mutágenos potenciales.

Los ensayos *in vivo* consumen más tiempo y recursos que los exámenes *in vitro*, el punto más importante para usarlos es que, muchos agentes mutagénicos y carcinogénicos necesitan

metabolizarse para poder ser activos. Los exámenes *in vitro* con sistemas microsomales son empleados cuando se utilizan este tipo de agentes.

Los métodos cromosómicos para evaluar el daño genotóxico de diversos agentes no está considerado como una prueba sobre un organismo específico ó como una mutación genética en un locus determinado, de tal manera que las inferencias obtenidas a través de estos métodos permiten ser extrapoladas casi a cualquier especie ó línea celular con respecto a las respuestas que producen los agentes genotóxicos (Díaz Barriga, 1995).

Los estudios citogenéticos evalúan principalmente dos tipos de acciones de los agentes genotóxicos sobre el material cromosómico; estos son: el efecto clastogénico, o sea cuando el agente produce rupturas cromosómicas y la acción genotóxica S independiente que se suscita en la etapa durante en la cual el ADN se replica. Por esta razón los primeros estudios citogenéticos enfocados a evaluar el efecto de agentes mutagénicos sobre los cromosomas comprenden los parámetros de evaluación de la frecuencia de aberraciones cromosómicas y más tarde el estudio de la frecuencia de los intercambios de cromátidas hermanas (Díaz Barriga, 1995).

Si bien las pruebas de elección para evaluar los agentes sospechosos de ser genotóxicos son muchas y muy variadas, existen dos etapas primordiales que deben ser tomadas en cuenta por cualquier ensayo de esta naturaleza. La primera etapa comprendería la detección del potencial genotóxico y la segunda etapa evaluar el riesgo-beneficio, ya que de esto último depende el control de los agentes genotóxicos estudiados.

### 1.7.1. Intercambio de Cromátidas Hermanas (ICH)

Una técnica común, ampliamente usada es el análisis de ICH, que como su nombre lo indica son intercambios de segmentos simétricos y equivalentes entre las cromátidas de un mismo cromosoma (Morales, 1988). Este fenómeno fué sugerido por McClintock en 1938, al percatarse que los cromosomas en anillo podían, eventualmente, originar anillos dicéntricos. Más tarde, Taylor, en 1958, mediante el análisis autorradiográfico de células cultivadas en presencia de timidina tritiada durante el primero de dos ciclos de división sucesivos, notó que había intercambios de segmentos entre la cromátida marcada y la no marcada. Posteriormente, se logró desarrollar el método de tinción diferencial de las cromátidas hermanas, que permiten detectar los ICH, aun cuando el segmento que intervenga en ellos sea muy pequeño. Este método se basa en incorporar un análogo de la timina la bromodesoxitridina (BrdU) al ADN y tificando con dibencimida y observandose en el microscopio de fluorescencia; o una variante que consiste en tratar los cromosomas con bibencimida, luz negra y posteriormente teñirlos con giemsa antes de analizarlos con el microscopio de campo claro (Fig. 14).

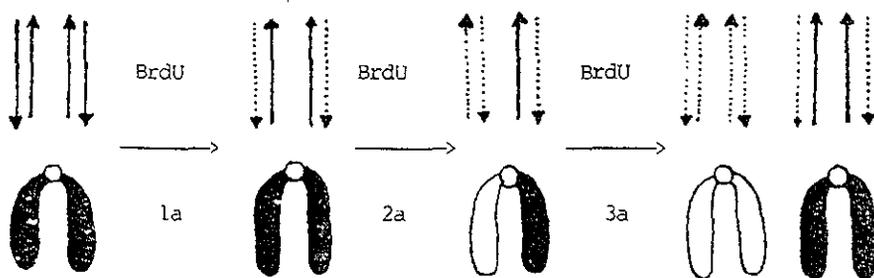


Fig 14 Esquema que muestra la tinción diferencial entre las cromátidas hermanas al adicionar BrdU en tres ciclos celulares (Morales, 1988)

Aún cuando el mecanismo de la formación de ICH no ha sido establecido, la importancia de los ICH como una medida de exposición para mutágenos o carcinógenos potenciales o como un indicador de anomalías en el mantenimiento de la homeostasis celular no puede ser menos. La elevada frecuencia de ICHs puede ser producida en respuesta a un daño al ADN.

Existen diferentes modelos que explican como ocurre el fenómeno de los ICH, la hipótesis más aceptada es la propuesta por Painter en 1980, la cual se basa en un modelo en el que los rompimientos de doble cadena son generados en la conjunción entre un replicón completamente duplicado y otro parcialmente duplicado; sugiere que estas conjunciones o sitios de separación son susceptibles a rompimientos de doble cadena durante la replicación, lo cual se hace factible con la presencia de la enzima topoisomerasa II; de esta manera la detención de la replicación provoca la asincronía en la replicación, lo que aumenta la posibilidad de dobles rupturas después de que una unidad haya terminado su duplicación.

La evidencia que implica a los ICHs de tener significado biológico, deriva de estudios *in vitro* con mutágenos y carcinógenos conocidos. Perry y Evans (1975) claramente demostraron en células de ovario de hamster chino (CHO) que los ICHs son inducidos por una gran variedad de mutágenos, y que la inducción es dosis dependiente.

En la actualidad, los sistemas de análisis de los ICHs pueden considerarse ensayos para determinar el efecto genotóxico de diversas sustancias. Hay evidencia de que, para muchos agentes, el estudio de los ICH proporciona el índice más sensible para detectar el daño genético. Por eso, el Comité de Genética Toxicológica de EE.UU lo ha incluido como un sistema de prueba

El ensayo de ICHs puede realizarse tanto *in vivo* como *in vitro*. El primero tiene ciertas ventajas ya que simula más claramente el efecto de los agentes genotóxicos y permiten que estos sean activados o inactivados metabólicamente. 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 , 1988).

Se han descrito diferentes variedades de sistemas *in vivo*, como embriones de pollo, espermatozonias de ratón , médula ósea de hamster chino, médula ósea de ratón y glandula salival de ratón entre otras. 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 es corto y bien conocido en relación a otros (Perry, 1974, Sanderbg, 1984).

*OBJETIVOS*

*E*

*HIPOTESIS*

## 2. OBJETIVOS

### Objetivo General

- ◆ Evaluar el efecto antigenotóxico de un extracto acuoso de Gordolobo (*Gnaphalium oxyphyllum*) contra el efecto mutagénico de la daunorrubicina por medio de la frecuencia de intercambio de cromátidas hermanas.

### Objetivos Particulares

- ◆ Objetivos Particulares Determinar el efecto genotóxico del Gordolobo mediante la frecuencia del intercambio de cromátidas hermanas en médula ósea de ratón.
- ◆ Determinar el efecto antigenotóxico del Gordolobo mediante la disminución de la frecuencia de ICHs en médula ósea de ratones tratados con daunorrubicina.
- ◆ Realizar el estudio de proliferación celular en ratones administrados con diferentes tratamientos.
- ◆ Determinar el índice mitótico en las células de la médula ósea de los ratones tratados

## 3. HIPOTESIS

Si el extracto de Gordolobo (*Gnaphalium oxyphyllum*) posee capacidad antigenotóxica, entonces será capaz de reducir la frecuencia de intercambio de cromátidas hermanas producidas por la daunorrubicina.

*MATERIAL*

*Y*

*METODOS*

## MATERIAL Y METODOS

### Material biológico

Ratones machos cepa NIH de aproximadamente 25 gr. de peso, donados por el Instituto Nacional de Higiene y el Instituto Nacional de Salud Pública.

### Material

Costuche de disección

Jeringas de 1 ml. y 10 ml.

Portaobjetos y Cubreobjetos

Pipetas graduadas 1, 2, 5, y 10 ml.

Pipetas Pasteur

Vasos de pp. de 50, 100, 250, 500 ml.

Vasos Copplin

Tubos de centrifuga de 15 ml.

Cámara de luz negra

Centrifuga

Bomba de vacío

Órtex

Balanza granataria y analítica

Jaulas para ratones

### Soluciones

Extracto de Gordolobo. *Gnaphalium oxyphhyllum*

Daunorrubicina (Cerubidine). Roger Bellon

Ciclofosfamida (Genoxal). Sanfer

Colchicina 0.04 %

Agua bidestilada

Soln. de KCl 0.075 M

5-bromodesoxiuridina (5-BrdU)

Metanol

Acido acético

Giemsa

Solución de citratos-fosfatos (2xSSC)

Buffer de fosfatos pH= 6.8

Colorante bisbenzimidida Hoescht 33258

## Metodología

### Obtención del extracto de Gordolobo

Para poder obtener el extracto de la planta de Gordolobo, se procedió a pesar 30 gr. de toda la planta seca, y puesta a infusión acuosa con vacío durante una semana.

Nota: La planta de Gordolobo previamente ya había sido identificada por claves botánicas, comparación bibliográfica y corroborada con los herbarios de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas y de la UNAM (Berdeja, 1996).

### Determinación de la dosis letal cincuenta (DL<sub>50</sub>) del extracto de Gordolobo

Se realizó primeramente dicho parámetro para poder establecer las dosis de trabajo, tanto para el ensayo genotóxico, como para el antigenotóxico; la determinación de la DL<sub>50</sub> fue realizada siguiendo el método de Lorke (Lorke, 1983).

Los animales que tuvieron un peso promedio de 26.3 gr. se distribuyeron en 3 lotes de tres ratones cada uno, a los que se les administró por vía oral las dosis de 10, 100 y 1000 mg/kg del extracto (Etapa 1), se registran los animales muertos a las 24 horas. Con los datos obtenidos, posteriormente se administraron dosis de 1600, 2900 y 5000 mg/Kg, utilizando un animal por dosis (Etapa 2), observando a los animales a las 24 horas. Para calcular la DL<sub>50</sub>, se realiza la media geométrica entre las dosis en donde sobreviven y en la que muere el ratón.

### Ensayo Genotóxico

Los ratones fueron distribuidos en 4 lotes de cinco ratones cada uno, se les implantó en un estado subcutáneamente una tableta de 5-BrdU.

Treinta minutos después, a los lotes se les asignó el siguiente tratamiento:

No. Lote	Tratamiento
1	Agua (vo)
2	Extracto de gordolobo 500 mg/Kg (vo)
3	Extracto de gordolobo 1000 mg/Kg (vo)
4	Ciclofosfamida 50 mg/Kg (vi)

Transcurridas 21 hrs. de haber implantado la tableta, a todos los ratones se les administró clomicina a una dosis de 900  $\mu$ g/ Kg por vía intraperitoneal. Tres horas después se sacrificaron los animales por dislocación cervical, se les extrajo el fémur, se limpio y se les cortaron las epífisis, se sacó la médula ósea con 7 ml. de KCl 0.075 M a 37°C, el contenido medular se recibió en tubos de centrífuga con 1 ml. de KCl sumergidos en un baño maria a 37 °c, incubándose por 5 min.

El paquete celular se fijo tres veces con una solución de metanol-ácido acético 3:1.

Obtenida la suspensión celular, se realizaron las laminillas por goteo, flameándolas por unos segundos. Se dejaron madurar por dos días, para posteriormente realizar la tinción diferencial.

#### Tinción diferencial

Sobre las laminillas se colocaron 6 gotas de solución de trabajo (1 ml. de soln. Stock de Hoechst 33258 a una concentración de  $10^{-4}$  M + 9 ml. de H<sub>2</sub>O + 10 ml. de buffer de fosfatos-citratos pH = 7 ), se montaron con cubreobjetos y se dejaron a 20 min. en obscuridad.

Posteriormente se introdujeron en una barra, colocando buffer de fosfatos-citratos pH= 7 dilución 1:1 al raz del portaobjetos.

Enseguida se expusieron a luz negra (luz ultravioleta longitud de onda cercana) por 90 min. a una distancia de 1 cm.

Pasado el tiempo, las laminillas se secaron y enjuagaron con H<sub>2</sub>O destilada y se sumergieron en solución salina de citratos a 60°C por 20 min. A continuación se secaron y se tñieron con Giemsa en una solución reguladora de fosfatos pH = 6.8 por 10 minutos.

### Observación al microscopio

#### + Intercambio de Cromátidas Hermanas (ICH)

Para obtenerlo se procedió a localizar 30 metafases que se encontraran en segunda división celular, observando en cada metafase el número de intercambios de cromátidas hermanas con el objetivo de inmersión (100x), para cada uno de los ratones de los diferentes tratamientos.

#### + Índice Mitótico (IM)

Se realizó contando el número de metafases que se encontraron en un total de 1000 células, también por cada uno de los ratones.

### Cinética de Proliferación Celular

Se obtiene al contar el número de metafases en primera, segunda y tercera división celular en un total de 100 metafases por cada ratón.

$$CPK = 21 / (1 M_1 + 2 M_2 + 3 M_3) \quad 100$$

#### + Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó con análisis de varianza (ANOVA)  $\alpha = 0.05$ , y la comparación entre medias se efectuó con la prueba t-student  $\alpha = 0.05$ . El tiempo promedio de generación se evaluó con la prueba Ji cuadrada.

## Ensayo antigenotóxico

Los ratones fueron distribuidos en 10 lotes de cinco ratones cada uno, se les implantó en un estado subcutáneamente una tableta de 5-BrdU.

Treinta minutos después, se les administró el siguiente tratamiento:

No. Lote	Tratamiento
1	Agua (vo)
2	Extracto de gordolobo 50 mg/Kg (vo)
3	Extracto de gordolobo 250 mg/Kg (vo)
4	Extracto de gordolobo 500 mg/Kg (vo)
5	Extracto de gordolobo 1000 mg/Kg (vo)
6	Daunorrubicina 10 mg/Kg (vi)
7	Extracto de gordolobo 50 mg/Kg (vo) + Daunorrubicina 10 mg/Kg (vi)
8	Extracto de gordolobo 250 mg/Kg (vo) + Daunorrubicina 10 mg/Kg (vi)
9	Extracto de gordolobo 500 mg/Kg (vo) + Daunorrubicina 10 mg/Kg (vi)
10	Extracto de gordolobo 1000 mg/kg (vo) + Daunorrubicina 10 mg/Kg (vi)

(vo)- vía oral; (vi) - vía intraperitoneal

El procedimiento de tinción diferencial, la observación microscópica y el análisis estadístico se realizó de manera similar al ensayo genotóxico.

Cálculo para determinar el Índice de Inhibición (I. I.)

$$I.I. = 1 - \frac{ICH(\text{Tratamiento}) - ICH(\text{Testigo negativo})}{ICH(\text{Testigo positivo}) - ICH(\text{Testigo negativo})} \times 100$$

$$ICH(\text{Testigo positivo}) - ICH(\text{Testigo negativo})$$

# *RESULTADOS*

## RESULTADOS

### Obtención del extracto de Gordolobo

La concentración final que se obtuvo de extracto fue de 30 gr / 300 ml. que se mantuvieron a una temperatura de -70 °C para su conservación

### Determinación de la DL<sub>50</sub> del extracto

En la etapa 1, en los ratones que se les administraron dosis de 10, 100 y 1000 mg/Kg, no hubo animales muertos. Debido a estos resultados, se procedió a utilizar dosis de 1600, 2900 y 5000 mg/Kg, en donde también no hubo muertos. Por lo que se determinó que el extracto de gordolobo no es tóxico.

### Ensayo Genotóxico

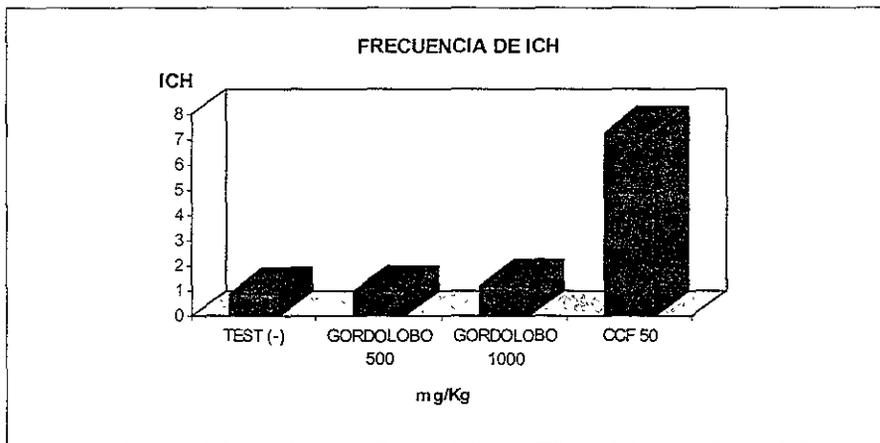
En la tabla 3 se observa el promedio de ICHs obtenido al observar 30 metafases por ratón, haciendo un total de 150 metafases analizadas por lote, obteniéndose los siguientes resultados:

#### Intercambio de Cromátidas Hermanas

No. Lote	Tratamiento (mg/Kg)	ICH $\pm$ d. e.
1	Agua	0.9 $\pm$ 0.09
2	Extracto de gordolobo 500	1.0 $\pm$ 0.12
3	Extracto de gordolobo 1000	1.2 $\pm$ 0.14
4	Ciclofosfamida 10	*7.3 $\pm$ 0.96

\* Diferencia estadísticamente significativa con respecto al testigo negativo, ANOVA, t-student  $\alpha = 0.05$

Tabla 3. Frecuencia de ICHs en médula ósea de ratones tratados con extracto de Gordolobo y CCF.



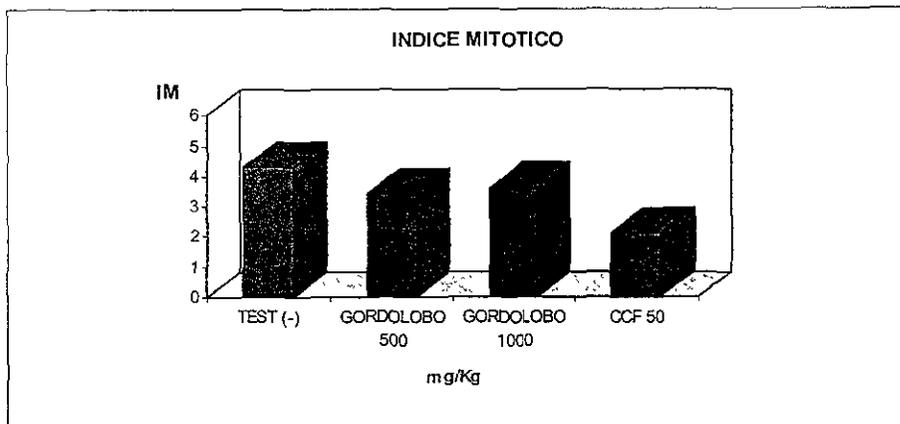
Gráfica 1. Frecuencia de ICHs en los tratamientos con Gordolobo y CCF

#### Indice Mitótico

La determinación del índice mitótico señala la capacidad de división celular, en la cual una célula madre origina a dos células hijas. Como se muestra en la tabla y en la gráfica no existen diferencias estadísticamente significativas (ANOVA, t-student  $\alpha = 0.05$ ).

No. Lote	Tratamiento (mg/Kg)	IM $\pm$ d. e.
1	Agua	4.3 $\pm$ 0.94
2	Extracto de gordolobo 500	3.4 $\pm$ 0.11
3	Extracto de gordolobo 1000	3.6 $\pm$ 0.60
4	Ciclofosfamida 10	2.1 $\pm$ 0.60

Tabla 4. Índice mitótico de ratones tratados con Gordolobo y CCF.



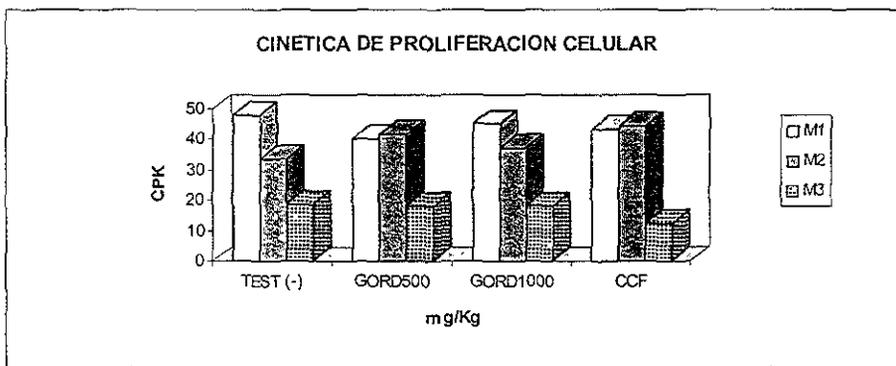
Gráfica 2. Índice mitótico en los lotes tratados con Gordolobo y CCF

### Cinética de Proliferación Celular

En los resultados obtenidos en la cinética de proliferación celular, tampoco se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los lotes (ANOVA, t-student  $\alpha = 0.05$ ), como se muestra en la tabla y en la gráfica.

No. Lote	Tratamiento (mg/Kg)	1M	2M	3M	TPG (hr) $\pm$ d.e.
1	Agua	47.8	33.6	18.6	12.29 $\pm$ 0.49
2	Extracto de gordolobo 500	40.0	41.8	18.2	12.19 $\pm$ 0.48
3	Extracto de gordolobo 1000	45.0	37	18	12.21 $\pm$ 0.20
4	Ciclofosfamida 10	43.4	44.2	12.4	13.00 $\pm$ 0.57

Tabla 5. Cinética de proliferación celular y tiempo promedio de generación en los ratones administrados con Gordolobo y CCF.



Gráfica 3. Cinética de Proliferación Celular en ratones tratados con Gordolobo y CCF

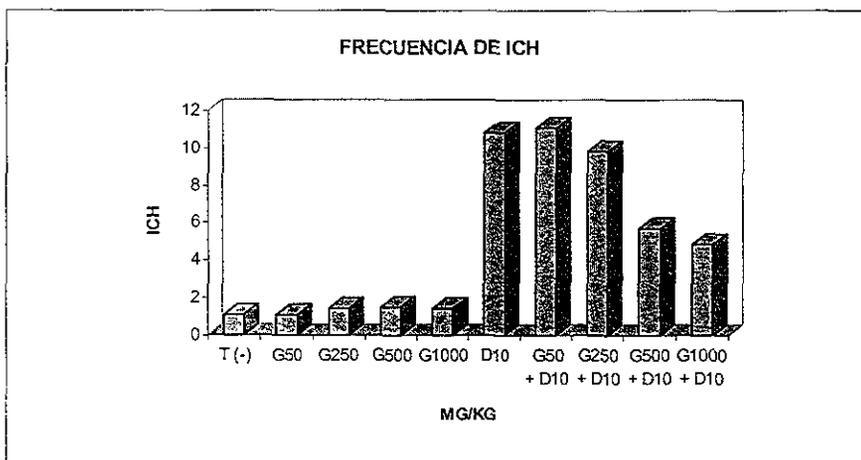
### Ensayo Antigenotóxico

#### Intercambio de Cromátidas Hermanas

No. Lote	Tratamiento (mg/Kg)	ICH $\pm$ d.e.	% de Inhibición
1	Agua	1.17 $\pm$ 0.11	
2	Gordolobo 50	1.1 $\pm$ 0.14	
3	Gordolobo 250	1.4 $\pm$ 0.04	
4	Gordolobo 500	1.5 $\pm$ 0.07	
5	Gordolobo 1000	1.4 $\pm$ 0.12	
6	Daunorrubicina 10	10.8 $\pm$ 0.43	
7	Gordolobo 50 + Daunorrubicina 10	11.1 $\pm$ 0.57	-
8	Gordolobo 250 + Daunorrubicina 10	9.8 $\pm$ 0.37	11
9	Gordolobo 500 + Daunorrubicina 10	5.7 $\pm$ 0.4	53
10	Gordolobo 1000 + Daunorrubicina 10	4.9 $\pm$ 0.1	61

❖ Diferencia estadísticamente significativa con respecto al testigo positivo, ANOVA, t-student  $\alpha = 0.05$

Tabla 6 . Promedios de ICHs obtenidos en los animales tratados con Gordolobo, daunorrubicina y la combinación de ambos agentes.



T- Testigo negativo; G- Gordolobo; D- Daunorrubicina

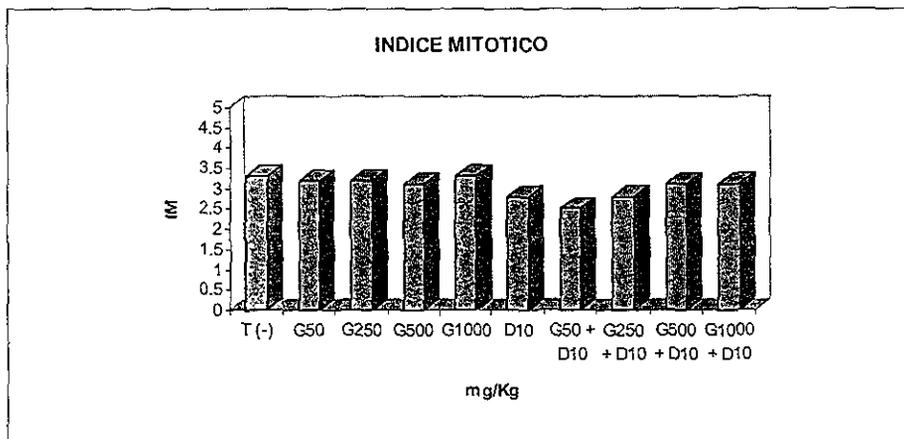
Gráfica 4. Frecuencia de ICHs en los tratamientos con Gordolobo, Daunorrubicina y la combinación de ambos.

#### Indice Mitótico

No. Lote	Tratamiento (mg/Kg)	IM $\pm$ d.e.
1	Agua	3.3 $\pm$ 0.22
2	Gordolobo 50	3.2 $\pm$ 0.21
3	Gordolobo 250	3.2 $\pm$ 0.16
4	Gordolobo 500	3.1 $\pm$ 0.14
5	Gordolobo 1000	3.3 $\pm$ 0.32
6	Daunorrubicina 10	*2.8 $\pm$ 0.10
7	Gordolobo 50 + Daunorrubicina 10	*2.5 $\pm$ 0.11
8	Gordolobo 250 + Daunorrubicina 10	*2.8 $\pm$ 0.24
9	Gordolobo 500 + Daunorrubicina 10	3.1 $\pm$ 0.23
10	Gordolobo 1000 + Daunorrubicina 10	3.0 $\pm$ 0.20

\* Diferencia estadísticamente significativa con respecto al testigo negativo, ANOVA, t-student  $\alpha = 0.05$

Tabla 7. Indice mitótico de los ratones tratados con Gordolobo, daunorrubicina y la combinación de ambos agentes.



T- Testigo negativo; G- gordolobo; D- Daunorrubicina

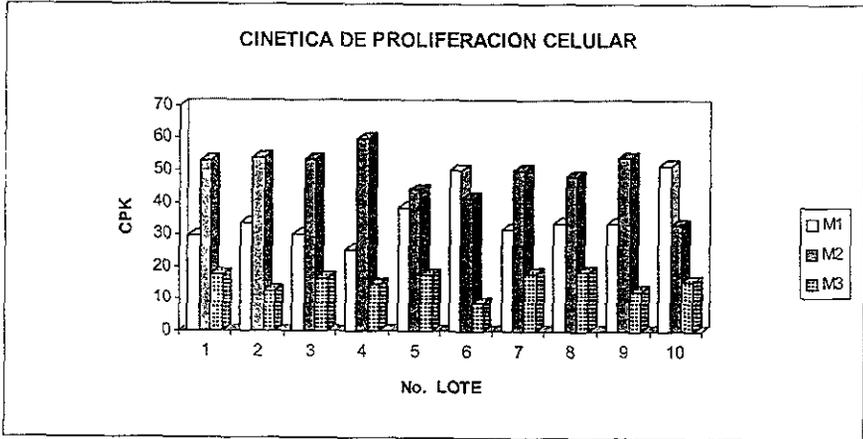
Gráfica 5. Índice Mitótico de los tratamientos con Gordolobo, Daunorrubicina y la combinación de ambos

#### Cinética de Proliferación Celular

No. Lote	Tratamiento (mg/Kg)	1M	2M	3M	TPG(hr) ± d.e.
1	Agua	29.8	52.8	17.4	11.19 ± 0.11
2	Gordolobo 50	33.6	53.8	12.6	12.13 ± 0.53
3	Gordolobo 250	30.2	53.4	16.4	11.27 ± 0.15
4	Gordolobo 500	25.4	59.8	14.8	11.08 ± 0.43
5	Gordolobo 1000	38.4	44	17.6	12.11 ± 0.32
6	Daunorrubicina 10	50.0	41.4	8.60	*13.40 ± 0.45
7	Gordolobo 50 + Daunorrubicina 10	31.8	50.2	18.0	11.27 ± 0.15
8	Gordolobo 250 + Daunorrubicina 10	33.4	48.0	18.6	11.34 ± 0.36
9	Gordolobo 500 + Daunorrubicina 10	33.4	54.0	12.6	12.11 ± 0.35
10	Gordolobo 1000 + Daunorrubicina 10	51.4	33.2	15.4	*13.20 ± 0.86

\* Diferencia estadísticamente significativa con respecto al testigo negativo, ANOVA, t-student  $\alpha = 0-05$

Tabla 8. Cinética de proliferación celular y tiempo promedio de generación en ratones administrados con Gordolobo, daunorrubicina y la combinación de ambos agentes.



Gráfica 6. Cinética de Proliferación Celular en los ratones tratados con Gordolobo, Daunorrubicina y la combinación de ambos

## *DISCUSSION*

## 6. DISCUSION

Es sabido que desde la época prehispánica la planta del Gordolobo se ha consumido, sin haberse presentado ningún efecto nocivo. El estudio de la dosis letal media del extracto de Gordolobo aquí presentada demostró no ser tóxico, probándose dosis altas de hasta 5 000 mg/Kg sin presentar alguna alteración observable en los animales. Lorke (1988) en su trabajo menciona que un compuesto al no producir algún efecto a la dosis mencionada, es considerado como atóxico. Jankun (1997) recientemente comentó que los tés de polifenoles, bebida que bien puede ser comparada con el extracto estudiado por sus constituyentes similares, pueden ser consumidos en altas dosis fuera de algún efecto toxicológico.

El estudio fitoquímico preliminar del extracto de Gordolobo demostró que contiene diversos componentes, como lo son los taninos, quinonas, antraquinonas, alcaloides y flavonoides, como con otros tés y extractos estudiados con componentes similares a los del Gordolobo, se ha inferido que las propiedades antioxidantes que se les atribuyen es debido a la acción de los flavonoides.

Ahora bien, se ha discutido en diversas investigaciones que alimentos que contienen flavonoides, como es el caso del Gordolobo; y los mismos flavonoides han presentado efectos mutagénicos y carcinogénicos en ensayos *in vitro* (Ames, 1983). Debido a esta cuestión, se procedió a determinar si el extracto empleado, podría tener efectos genotóxicos al determinarse la frecuencia de ICHs; para este estudio se utilizó a la ciclofosfamida como testigo positivo, por saber que este agente es un muy buen inductor de ICHs (Natarajan, 1981), confirmándose dicho efecto en el ensayo al obtener un número de 78 de ICHs como se muestra en la tabla 3. Así mismo, en esta tabla podemos observar que el Gordolobo en las concentraciones empleadas de 500 y 1000 mg/Kg no aumentaron el número de ICHs, no habiendo diferencias estadísticamente

significativas con respecto al testigo negativo (ANOVA, t-Student  $\alpha = 0.05$ ), observándose los mismos resultados en el índice mitótico y en la cinética de proliferación celular, por lo que podemos considerar que el extracto no es genotóxico, ni citotóxico.

Examinando los resultados anteriores, se dedujo, que el extracto de Gordolobo podía ser un buen candidato para probarse como un agente antígenotóxico, debido a que plantas del mismo género del Gordolobo exhiben propiedades antioxidantes, como fuertes atrapadores de radicales libres (Asaka, 1992), de tal manera que se procedió a realizar el ensayo para estudiar el efecto antígenotóxico, también evaluando la frecuencia de ICHs. Para dicho estudio se utilizó a la daunorrubicina, que como se ha visto es un potente generador de radicales libres y un gran inductor de ICHs (Goodman, 1996). Tal efecto, se comprobó en el ensayo, ya que la daunorrubicina indujo 10.8 ICHs en las células de médula ósea de los ratones, como se muestra en la tabla 6. Los resultados también confirman que el extracto de Gordolobo no es genotóxico al presentar un número de ICHs similares al del testigo negativo, los cuales no son estadísticamente significativos con respecto a éste. Pero es de mayor importancia, observar que los animales tratados con la daunorrubicina y el extracto de Gordolobo a las dosis de 250, 500 y 1000 mg/Kg, disminuyeron el número de ICHs considerablemente, hasta un 61 % en la dosis más alta, habiendo diferencias estadísticamente significativas con el testigo positivo (ANOVA, t-Student  $\alpha = 0.05$ ).

Ahora bien, en el ensayo antígenotóxico se observó que la disminución en el número de ICHs en los lotes tratados con el extracto más la daunorrubicina, es proporcional a las dosis empleadas del extracto. Existen investigaciones de diferentes plantas como el té negro y el té verde, en las que dan una relación en peso seco de la planta, en donde aproximadamente el 30 % corresponde a compuestos flavonoides (Yang, 1993). Si así fuera, para el ensayo, la cantidad aproximada de

compuestos que dieran la actividad antioxidante en el extracto oscilaría entre 6 y 27 mg, en las dosis en las que se presentó disminución del número de ICHs.

No se han encontrado estudios *in vivo* en donde se relacione inhibición de daño genético con tratamientos en los que se usen extractos de flavonoides; pero existe un estudio *in vitro* en donde se determinaron micronúcleos en células V79 inducidos por mitomicina C, así como la transformación celular de células BALBc/3T3 inducidas con 3-metilcolantreno, protegidas con extractos de té de flavonoides; en donde se observaron porcentajes de inhibición del 49.7 y 59.5 % en concentraciones de flavonoides de 200 mg/L (Han, 1997), porcentajes de inhibición semejantes a los obtenidos en el ensayo.

El extracto sólo en las concentraciones probadas no aumentó el número de ICHs, estos valores son muy similares a los del control negativo usado. La mayoría de las investigaciones con propiedades y constituyentes parecidos a las del Gordolobo presentan resultados semejantes y sólo en muy pocos casos los efectos son contrarios.

El mecanismo de acción, por el cual el extracto acuoso de Gordolobo disminuye el número de ICHs, se ha propuesto en base a los constituyentes del extracto, a los que se les ha demostrado su actividad antigenotóxica, es decir los flavonoides, a los cuales se les ha probado efectos antioxidantes.

Los estudios con estas tendencias argumentan que los flavonoides provenientes de productos naturales tienen una amplia variedad de efectos benéficos pero que, sin embargo, también causan diferentes tipos de daños, como la formación de estados pro-oxidantes, que pueden conducir al daño celular (Arnes 1983, 1989). Esta actividad dual se ha visto también en la vitamina C, dependiendo esta de la concentración y la disponibilidad de otros reaccionantes.

El estado redox de los flavonoides influye su actividad con metales quelantes. La importancia de los metales de transición, en especial del hierro (III) con la complejación de los flavonoides, radica en que estos pudieran actuar como competidores con la daunorrubicina por el hierro. Como se sabe, la daunorrubicina en algunas de sus principales funciones es la de reaccionar con el hierro para formar especies reactivas de oxígeno por reacciones Fenton, así como también para formar el complejo daunorrubicina-hierro para intercalarse en el ADN. Es así, como las propiedades complejo-metálicas de las moléculas de los flavonoides podrían hacer alguna contribución a su actividad total (Metodiewa, 1997; Lukner, 1990; Letan, 1966). Entre los flavonoides presentes en las diferentes especies de *Gnaphalium* se encuentran una gran variedad de compuestos flavonoides metoxilados, que podrían dar una mayor estabilidad a los complejos formados por metales que con los complejos formados con la daunorrubicina.

Los resultados de varias investigaciones *in vitro* e *in vivo* desarrolladas recientemente sugieren una relación estructura-actividad en la capacidad de los flavonoides para actuar como antioxidantes. Los siguientes tres factores estructurales juegan un papel importante en este proceso: la presencia del grupo catecol en el anillo B (Sanz, 1994); el doble enlace 2-3 en conjugación con el 4-oxo de un grupo carbonil en el anillo C; y la presencia adicional de grupos OH en el anillo A y B como se muestra (Fig. 15) (Metodiewa, 1997).

Estas propiedades estructurales son capaces de proveer de facultades quelantes de hierro y atrapadores de radicales libres además de actividades inhibitorias de enzimas por ejemplo la xantina oxidasa (Cos, 1998; Robak, 1988).

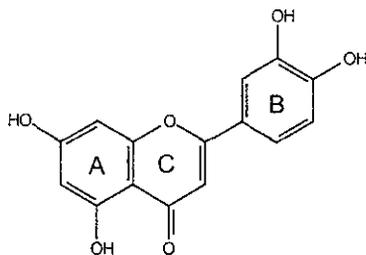


Fig.15. Factores estructurales involucrados en los mecanismos antioxidantes (Metodiéwa, 1997).

Las especies reactivas de oxígeno formadas a partir de la metabolización de la daunorrubicina pueden ser atrapadas por las estructuras características de los flavonoides presentes en el Gordolobo, como se ha visto por diferentes mecanismos; y así proteger o disminuir del daño genético, y en sí el número de ICHs, producidos por radicales libres.

Pero, es necesario definir las especies químicas responsables de la naturaleza protectora que se ha encontrado a el extracto de Gordolobo.

# *CONCLUSIONES*

## 7. CONCLUSIONES

1. El extracto acuoso de Gordolobo en las dosis estudiadas de 500 y 1000 mg/Kg no presentó actividad genotóxica, ni citotóxica

2. En el ensayo antigenotóxico, el extracto de Gordolobo a las dosis de 250, 500 y 1000 mg/Kg disminuyeron el número de ICH en las células expuestas con daunorrubicina, el cual fue un fuerte inductor de ICHs, determinando así que el Gordolobo (*Gnaphalium oxyphyllum*) ejerce un efecto protector en las células, lográndose con la dosis mayor, un índice de inhibición del 61 %.

3. El índice mitótico no se alteró en los tratamientos con Gordolobo, y el tiempo promedio de generación mostró un aumento estadísticamente significativo, solamente con la dosis de 1000 mg/Kg de Gordolobo más la daunorrubicina.

# *BIBLIOGRAFIA*

### 3. Bibliografía

1. Aguilar, A., Camacho, J. Chino, S., (1996). "Plantas medicinales del herbario IMSS", Ediciones IMSS, pág. 62, 678-680.
2. Ames, B. (1983). Dietary carcinogenesis and anticarcinogens; Science. 221:1256-1264.
3. Ames, B., Shigenaga, M., Hagen, T., (1993). Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging, Proc. Natl. Acad Sci. 90: 7915-7922.
4. Asaka, Y., Ohsaki, A., Kubota, T., (1992). 5, 7, 3', 4'-Tetrahydroxy-3-methoxy, a potent antitumor promoter isolated from *Gnaphalium indicum*; Kyoto furitsu Ika Daigaku Zasshi. 101:4, 335-339.
5. Balz Frei, (1994). "Natural antioxidants in human health and disease"; Academic Press, U.S.A., pág. 25-62, 107-128.
6. Ballantyne, B., (1993). "General & Applied Toxicology". vol. 2; Stockton Press. Great Britain by the Bath Press Ltd.
7. Barz, W., (1975). Metabolism of Flavonoids. In "The Flavonoids", Chapman & Hall, London, pág. 970-1056.
8. Berdeja, B., Ramos, Z., Villegas, M., (1996). Memorias del V Simposium de Botánica; Estudio fitoquímico preliminar de dos especies de *Gnaphalium* L. compositae de uso medicinal, presentes en los mercados de la ciudad de México, La Habana, Cuba, pág. 101-102.
9. Bors, W., Heller, W., Stettmaier, K., (1993) "Free Radicals: from Basic Science to Medicine. Electron paramagnetic resonance studies of flavonoid compounds", Birkhäuser Verlag Basel, Switzerland, pág. 374, 387.
10. Bruneton, J., (1986) "Elementos de Fitoquímica y Farmacognosia", Ed. Acribia, España, 157-167.

1. Brusick, D., (1987). "Principles of Genetics Toxicology", 2a. editions, Plenum Press, U.S A. pág. 193-196
2. Burton, G., Hughes, L., Foster, D., Pietrzak E., (1993), Free Radicals: From Basic Science to Medicine, Antioxidant mechanisms of vitamin E and  $\beta$ -carotene, Birkhäuser Verlag Basel, Switzerland, pág. 388-399.
3. Burdon, R. (1990). "Free Radicals: from Basic Science to Medicine", Birkhäuser Verlag Basel , Switzerland, pag. 187-198.
4. Caceres, A., Cano, O., Samayoa, B., Aguilar, L., (1990). Plants used in Guatemala for the treatment of gastrointestinal disorders. J. Ethnopharmacol. 30:55-73.
5. Caceres, A; Ovando, A; Samayoa, B; Alvarez, A., (1991). Plants used in Guatemala for the treatment of respiratory diseases. J. Ethnopharmacol. 31:193-208.
6. Cerutti, P. A. (1985). Prooxidant states and tumor promotion; Science. 227: 375- 380.
7. Cerutti, P., Shah, G., Peskin, A., (1993). "Free Radicals from Basic Science to Medicine", Birkhäuser Verlag Bael, Switzerland, pág. 206-217.
8. Cos, P., Ying, L., Calomme, M., Hu, J., (1998). Structure-Activity Relationship and classification of flavonoids as inhibitor of Xanthine oxidase and superoxide scavengers, J. Nat. Prod. 61: 71-76.
9. Cuadra, P., Fajardo, V., Muñoz, O., Arrieta, A., (1994). Determination of the effect of 8-O-(2-methyl-2-buteonyl)-5,7-dihydroxy-3-methoxyflavone from *Gnaphalium robustum* on growth of *Escherichia coli* K-12 by optical density and electrical conductance measurements, Plant Med. 60(6):598-599.

0. Chibowska, Y. Chibowski, D., Celinski, K., (1996). Ultrastructural studies of daunorubicin hepatotoxicity in rats including protective effects of tocopherol and ascorbic acid. *Pol. J. Pathol.* 47(3): 119-126.
1. Das, D., Essman, W., (1990). "Oxygen Radicals: Systemic Events and Disease processes", KRAGER Press, Switzerland, pág. 129-148.
2. Diaz Barriga, (1995). Genotoxicidad; Primer Simposium de Toxicología Ambiental, FES-C, UNAM. México.
3. Dioudis, C., Papageorgiou, G., Botsoglou, N., (1996). Lipid peroxidation and antioxidant defense mechanisms in rat renal tissue after daunorubicin administration. *Ren. Fail.* 18(4): 537-543.
4. Dominguez, X., (1973). "Métodos de Investigación Fitoquímica", Ed. Limusa, México. pág 81-89.
5. Etienne, D., (1988). "Genetic Biochemistry from Gene to Protein". Plenum Press. England.
6. Ferguson, L., Baguley, B., (1994). Topoisomerase II Enzymes and Mutagenicity, *Environ. Mol. Mutag.* 24: 245-261.
7. Flores, R., (1995). Carcinogenesis Química, Primer Simposium de Toxicología Ambiental, FES-C, UNAM., México.
8. Floyd, R. A., (1991). "Oxidative damage and repair: Chemical Biological and Medical Aspects"; Pergamon Press, Oxford, U.S.A. pp.175.
9. FNPC (Food Nutrition and the Prevention of Cancer: a Global perspective), (1997), World Cancer Research Fund Press, American Institute for Cancer Research, U.S.A. pág 54-70, 404-417, 421-427.

0. Freeman, B., (1982). Biology of diseases: Free Radicals and Tissue injury: Lab. Invest. 47: 412-426.
1. Frenkel, K., (1989). Oxidation of DNA bases by tumor promoter-activated processes. Environ. Health. Perspect. 81. 45-49.
2. Garro, A., Espina, N., Lieber, C., (1992). Cancer and Alcohol; Alcohol Health Res. World. 16: 81-86.
3. Goodman & Gilman, (1996). "Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica", 9a. edición, Ed. McGraw-Hill Interamericana. México, pág. 1343-1344.
4. Graf, U., (1997). Genotoxicidad en Drosophila, VII Congreso Nacional de Genética, UABC, México.
5. Gringauz, A., (1997). "Introduction to Medicinal Chemistry. How Drugs and Why". Wiley-VCH Press, U.S.A., pág. 126-127.
6. Halliwell, B., (1989). "Free Radicals in Biology and Medicine", 2a. edition, Oxford Univ. Press. London.
7. Han, C., (1997). Screening of anticarcinogenic ingredients in tea polyphenols, Cancer Letters. 114: 153-158.
8. Harris, E., (1992). Regulation of Antioxidant enzymes; FASEB J. 6: 2675-2683.
9. Herman, K., (1976). Flavonols and flavones in food plants: a review, J. Fd. Technol. 11: 433-448.
10. Horie, T., Kawamura, Y., Yamamoto, H., Kitou, T., Yamashita, K., (1995). Synthesis of 5,8-dihydroxy-6,7-dimethoxyflavones and revised structures for some natural flavones. Phytochemistry, 39(5):1201-1210.

41. Jankun, J., Selman, S., Swiercz, R., (1997), Why drinking green tea could prevent cancer, *Nature*. 387: 561
42. Joshi, P., Vig, P., (1996). Increase in brain nitric oxide synthase activity in daunorubicin-treated rats. *Pharmacol. Toxicol.* 78(2): 99-103.
43. Krinski, (1991). Biological Functions of  $\beta$ -carotene; *Am. J. Clin. Nutr.* 53: 238-243.
44. Kubo, Y., Yokokawa, Y., Kinst, H., (1995). Tyrosinase inhibitors from Bolivian medicinal plants, *J. Nat. Prod.* 58: 739-743.
45. Landi, L., (1992). The antioxidant activity of ubiquinol-3 in homogeneous solution and in liposomes. *Chem. Phys. Lipids.* 61: 121-130.
46. Latorre, Y., Pena, R., Erazo, S., (1990). Pharmacognosical investigation on three Compositae species used in folk medicine in central Chile, *An Real Acad. Farm.* 56:359-365.
47. Letan, A., (1966). The relation of Structure to Antioxidant Activity of Quercetin and some of its Derivatives. II. Secondary (Metal-Complexing) Activity, *J. Food. Sci.* 31: 395-399.
48. Levine, L., (1979). "Biología del Gen"; Ed. Omega, España.
49. Lorke, D., (1983). New approach to practical acute toxicity testing; *Arch. Toxicol.* 54: 275-287.
50. Luckner, M., (1990). Secondary Metabolism in microorganisms, plants and animals, 3a. edition, Springer-Verlag Press, U.S.A. pág. 406-413.
51. MacGregor, J., Wehr, C., Manners, D., (1983). In vivo exposure to plant flavonols. Influence on frequencies of micronuclei in mouse erythrocytes and sister-chromatid exchange in rabbit lymphocytes, *Mutat. Res.* 124: 255-270.
52. Metodiewa, D., Kochman, A., Karolczak, S., (1997). Evidence for antiradical and antioxidant properties of four biologically active N,N-dimethylaminoethyl ethers of flavone oximes: a

- comparison with natural polyphenolic flavonoid (rutin) action, *Biochem. Mol. Biol. Int.* 41 (5): 1067-1075.
33. Muller, L., Bruchelt, G., Niethammer, D., (1997). Effect of concentration on the cytotoxic mechanism of doxorubicin-apoptosis and oxidative DNA damage. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 230(2): 254-257.
34. Mongelli, E., Desmarchelier, C., Coussio, J., (1995). Antimicrobial activity and interaction with DNA of medicinal plants from the peruvian Amazon region, *Rev. Argent. Microbiol.* 27:199-203.
35. Morales, R., (1988). El daño a la información genética y los intercambios de cromátidas hermanas. *Ciencia y Desarrollo*, 14: 65-72.
36. Nakayama, T., Niimi, T., Kawakishi, S., (1992). The protective role of polyphenols in cytotoxicity of hydrogen peroxide. *Mutat. Res.* 281: 77-80.
37. Natarajan, A., (1981) "Mutagenic activity of 20 coded compounds in chromosome aberrations/sister-chromatid exchanges assay using Chinese hamster ovary (CHO) cells, in:", Serres and Ashby Eds *Evaluation of Short-Term Test for carcinogens*, Elsevier, U.S.A., pág. 551-559.
38. Negri, E., (1991). Vegetable and fruit consumption and cancer risk; *Int. J. Cancr.* 48: 354
39. Niki, E., (1993). "Free Radicals: From Science to Medicine. Antioxidant defenses in Eukarotic: an overview", Birkhäuser Verlag Basel, Switzerland, pág 365-373.
40. Nishino, H., Iwashima, A., Fujiki, H., Sugimura, T., (1984). Inhibition by quercetin of the promoting effect of telocidin on skin papilloma formation in mice initiated with 7,12-dimethylbenz(a)anthracene, *Gann*, 75.113-116.

- Dhrendorf, D., Schwarz, R., Hansel, R., (1971). 3,5,7-Trihidroxy-6.8-dimethoxyflavone from *Gnaphalium obtusifolium*, Arch. Pharm. 304:213-215.
- Orrenius, S., (1988). Calcium ions and oxidative cell injury; Symp. Mol. Cell. Biol. 82: 331.
- Ferry, P., (1974). New giemsa method for the diferential staining of sister chromatid ; Nature. 251: 156-158.
- Ferry, P. and Evans, H., (1975). Cytological detection of mutagen carcinogen exposure by sister chromatid exchange; Nature. 258: 121-125.
- Ramel, C., Alekperov. U., (1986) Inhibitors of mutagenesis and their relevance to carcinogenesis. Mutat. Res. 202: 285-306.
- Retsky, (1993). Ascorbic acid oxidation products protect human low density lipoprotein against atherogenic modification; J. Biol Chem. 268: 1304-1309.
- Robak, J., Grylewski, R., (1988). Flavonoids are scavengers of superoxide anions, Biochem. Pharmacol. 37 (5): 837-841.
- Robbins, C., (1990). "Patología Estructural y Funcional"; vol. 1, 4a. Edición, Ed. Interamericana McGraw-Hill. pág. 10-13, 536-539.
- Roberfroid, M., Buc Calderon, P., (1995). Free Radicals and Oxidation phenomena in biological systems, Marcel Dekker Press, U.S.A., pág. 121-141.
- Rothwell, N, (1983). "Understaning Genetics". 3a. Editions, Oxford Press, U.S.A
- Sahu, S., Gray, G., (1993). Interactions of flavonoids, trace metals, and oxigen: nuclear DNA damage and lipid peroxidation induced by myricotin, Cancer Lett. 70:73-79.
- Salamanca, F., (1991). Citogenética Humana, Ed Médica Panamericana, pp. 400.
- Sanderbg, (1984). "Sister Chromatid Exchanges". Plenum Publishing Corporation U.S.A

nz, M., Ferrandiz, M., Cejudo, M., Terencio, M., (1994). Influence of a series of natural  
 onoids on free radical generating systems and oxidative stress, *Xenobiotica*, 24(7): 699.

hreiber, J., Mottley, C., (1987). One-Electron Reduction of Daunomycin, Daunomycinone,  
 and 7-Doxydaunomycinone by the Xanthine/Xanthine Oxidase System: Detection of  
 semiquinone Free Radicals by Electron Spin Resonance. *J. Am. Chem. Soc.* 109: 348-351.

es, H., (1993). "Free Radicals: From Basic Science to Medicine. Medical Applications of  
 Antioxidants: an Update of current problems", Birkhäuser Verlag Basel, Switzerland, 419-423.

verman, R., (1992). *The organic Chemistry of Drug Design and Drug Action*, Academic  
 Press. U.S.A., pág. 242-258.

nic, M., (1988). Mechanims of inhibition of free-radical processes in mutagenesis and  
 carcinogenesis; *Mutation Res.* 212: 377-386.

mith, (1992). "Free Radicals Mechanims of Tissue Injury", Smiths CRC Press, U.S.A. pág.  
 22.

mith, R., (1993). "Farmacología", Ed Médica Panamericana, Argentina, pág. 918-919.

uza, R., Marleta, M, (1985). Inhibition of Cytochrome P-450 Activity in Rat Liver  
 microsomes by the Naturally Occurring Flavonoid, Quercetin, *Arch. Biochem. Biophys.*  
 0(1): 345-357.

ndman, E. R., (1990). Metal ion catalized oxidation of proteins: biochemical mechanims and  
 logical consequences; *Free Radicals Biol. Med.* 9: 315-325.

ndman, E. R., (1992). Protein Oxidation and aging; *Science.* 257: 1220-1224.

hibana, K., Okada, Y, Okuyama, T., (1995). Search for naturally occurring substances to  
 prevent the complications of diabetes III. Studies on active substances from *Gnaphalium*  
*ne.* *Nat. Med.* 49 3, 266-268.

Festa, B., Calwell, J., (1995). "The metabolism of Drugs and other Xenobiotics Biochemistry of Redox Reactions, Academic Press, U.S.A. pág. 223-224, 402-406.

Correnegra, R., Escarria, R., Dominguez, X., (1978). Flavonoides del *Gnaphalium pellitum*, *Rep. Latinoamer. Quím.* 9: 101.

Correnegra, R., Pedrozo, J. Fuentes, O., (1989). Flavonoids from *Gnaphalium gracile* H.B.K., *Int. J. Crude Drug Res.* 27:22-24.

Ulrich, (1985). Location and mobility of ubiquinones with diferent chain lengths in artificial membranes vesicles; *Biochemistry.* 24: 2501-2508.

Wagner, (1992). "Chromosomes a synthesis", Ed. Wiley-Liss, U.S.A.

Watson, J., (1987). "Molecular Biology of the Gene", 4a. edition, The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc., U.S.A., pág. 1006-1010, 1058-1061.

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

Weitberg, A., Weitzman, A., (1985). The effect of vitamin C on oxygen radical-induced sister.chromatid exchanges, *Mutat. Res.* 144: 23-26.

Vermuth, Camille G., (1996). "The Practice of Medicinal Chemistry"; Academic Press, U.S.A, pág. 652,653.

Westendorf, J., Marquardt, H., (1984). Structure-Activity Relationship of Anthracycline-Induced Genotoxicity in Vitro. *Cancer Res.* 44: 5599-5604.

White, R., (1991). The involvement of Free Radicals in the mechanims of monooxygenases. *Pharmacol. Ther.* 49: 21-42.

Wifsch, A., (1992). The systemic availability of oral glutathione; *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 43: 657-669.

- Wollenweber, E., Fritz, H. (1992). Rare Flavonoid Aglicones from *Anaphalis margaritacea* and two *Gnaphalium* species. *Z Naturforsch.* 48: 420-424.
- Yang, C., Wang, Z, (1993) Tea and Cancer, *Journal of the National Cancer Institute.* 85 (13): 1038-1049.
- Yang, C., (1997) Inhibition of carcinogenesis by tea. *Nature.* 389: 134.
- Zi, X., Mukhtar, H, Agarwal, R, (1997). Novel Cancer Chemopreventive Effects of a Flavonoid Antioxidant Silymarin: Inhibition of mRNA Expression of a Endogenous Tumor Promoter TNF $\alpha$ , *Biochem. Biophys Res. Commun.* 239: 334-339.