

50



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTILÁN

"PROTECCIÓN POR EXTRACTOS DE *Calendula officinalis* L.
DEL DAÑO GENOTÓXICO INDUCIDO POR EL
CARCINÓGENO DIETILNITROSAMINA EN CULTIVOS
PRIMARIOS DE HEPATOCITOS DE RATA"

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA:

JULIO ISRAEL PÉREZ CARREÓN

ASESORES:

M.V.Z. GERARDO CRUZ JIMÉNEZ
M.V.Z. JOSÉ ANTONIO LICEA VEGA
FES-CUAUTILÁN
DR. SAÚL VILLA TREVIÑO
CINVESTAV-IPN

CUAUTILÁN IZCALLI, EDO. DE MÉX. 2000

2000/1/18



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

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

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO

DR. JUAN ANTONIO MONTARAZ CRESPO
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN
P R E S E N T E

ATN: Q. Ma. del Carmen Garcia 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:

Protección por extractos de Calendula officinalis L. del daño
genotóxico inducido por el carcinógeno dietilnitrosamina en cultivos
primarios de hepatocitos de rata

que presenta El pasante: Julio Isael Pérez Carreón
con número de cuenta: 9041634-3 para obtener el título de:
Químico Farmacéutico Biólogo

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

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 9 de Octubre de 1 2000.

PRESIDENTE M.V.Z. Gerardo Cruz Jimenez

VOCAL Q.F.I. Leticia Zúñiga Ramírez

SECRETARIO Q.B.P. Judith Martínez Zamitiz

PRIMER SUPLENTE M.en C. Francisco López Mejía

SEGUNDO SUPLENTE Q.F.B. Virginia Oliva Arellano

Este trabajo de Tesis se realizó en el laboratorio número 50 del departamento de Biología Celular del CINVESTAV-IPN, bajo la dirección del Dr. Saúl Villa Treviño y la asesoría del M.V.Z. Gerardo Cruz Jiménez y el M.V.Z. José Antonio Licea Vega en la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán UNAM.

El presente trabajo se realizó con el apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, con el donativo 31665-N.

Dedico esta tesis a:

*Dios
Por permitirme realizar mis sueños*

*A la memoria de mi prima Karla Mara del Río Pérez
Por ser un ejemplo del amor que se le debe tener a la vida*

*A mis padres
María Eugenia Carreón Sánchez
José Utrero Pérez Sánchez
Por su amor y el apoyo que en todo momento me han brindado*

*A mis hermanos
Mirna Utrero y Ramón Eduardo
Por su amor y apoyo*

*A mi abuelita
Inés Sánchez
Por su cariño*

*Al amor de mi vida Mónica Lucía Murguía López
Por su amor, comprensión y apoyo.*

Agradecimientos

Al Dr. Saúl Villa Treviño, por permitirme realizar esta Tesis y aprender de él.

A mis asesores de tesis por sus sugerencias

A los profesores de la carrera de Químico Farmacéutico Biólogo de la F.F.B. Cuautitlán.

A mis compañeros de licenciatura.

A mis amigos, Itzia, Carlos, Karina, Anibal y Lulú por los momentos felices que vivimos

A mis amigos y compañeros del lab. 50, Samia, Evelia, Sergio, Claudia, Marisela, Dolores y Martha por su ayuda incondicional y apoyo.

ÍNDICE.

	Página
• Lista de abreviaturas	x
• Lista de figuras y tablas	xi
• Lista de gráficas	xii
• Resumen	xiii
1. Introducción	1
1.1 El cáncer un problema mundial, su definición y las características de sus células.	1
1.2 La etiología del cáncer tiene como base la mutación génica.	6
1.3 Las sustancias químicas en la carcinogénesis.	8
1.4 Dietilnitrosamina, un carcinógeno presente en el ambiente.	11
1.5 La reparación del ADN en la carcinogénesis.	13
1.6 La quimioprotección reduce el riesgo al cáncer.	15
1.7 Las flores de <i>Calendula officinalis</i> L, tienen múltiples propiedades farmacológicas.	18
1.8 Los cultivos primarios de hepatocitos (CPH) son útiles para estudiar la carcinogénesis.	20
1.9 El análisis de la síntesis de ADN no programada (UDS) permite medir el potencial genotóxico de sustancias químicas.	21
2. Objetivos	22
3. Hipótesis	22
4. Materiales	23
4.1 Reactivos	23
4.2 Biológicos	23
4.3 Soluciones	24

5. Metodología	25
5.1 Obtención de las flores de <i>Calendula officinalis</i> L.	25
5.2 Obtención de los extractos de <i>C. Officinalis</i> .	25
5.3 Espectroscopía de los extractos.	27
5.4 Cultivo primario de hepatocitos (CPH)	27
5.5 Daño genotóxico en CPH. Método de síntesis de ADN no programada (UDS).	29
5.6 Proceso para expresar la incorporación de timidina tritiada (T ³ H) en función de la cantidad de ADN.	30
5.7 Procesamiento de los datos.	31
5.8.1 Determinación del potencial genotóxico de dietilnitrosamina (DEN) en CPH.	31
5.8.2 Determinación del efecto genotóxico de DEN en combinación con los extractos.	32
5.8.3 Determinación del potencial genotóxico de los extractos.	32
6. Resultados	34
6.1 Genotoxicidad de la dietilnitrosamina (DEN)	34
6.2 Protección al ADN de la genotoxicidad de DEN por los extractos	34
6.3 Genotoxicidad de los extractos de <i>Calendula officinalis</i> L.	35
6.4 Resumen de los efectos de los extractos <i>Calendula officinalis</i>	36
Gráficas	37
7. Discusión	47
8. Conclusiones	52
9. Referencias	53

LISTA DE ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
bw	peso corporal
CG	Concentración genotóxica
Ci	Curie
CO-A	Extracto acuoso de <i>Calendula officinalis</i>
CO-C	Extracto clorofórmico de <i>Calendula officinalis</i>
CO-E	Extracto etanólico de <i>Calendula officinalis</i>
CO-H	Extracto hidroalcohólico de <i>Calendula officinalis</i>
CP	Concentración protectora contra DEN
CPH	Cultivo Primario de Hepatocitos
DEN	Dietilnitrosamina; N-etil-N-Nitrosoetanamina; N-Nitrosodietilamina (NDEA). (C ₂ H ₅) ₂ NNO
DMSO	Dimetil Sulfóxido
dpm	desintegraciones por minuto
EGTA	Ácido etilen glicol-bis(β-aminoetil eter) tetraacético
FTR	(Flat to round solution) Solución para despegar células en cultivo
HU	Hidroxiurea
MEM	Medio mínimo esencial
mRNA	Ácido ribonucleico mensajero
PBS	Solución salina amortiguadora de fosfatos
PCA	Ácido perclórico
ROS	Especies Reactivas de Oxígeno
T ³ H	Timidina Tritiada. [6- ³ H] Timidina
UI	Unidades Internacionales
UDS	Síntesis no programada de ADN
UV	Ultravioleta
w/v	masa (g) sobre volumen (ml)

LISTA DE FIGURAS Y TABLAS.

	Página
Figura 1.	
Etapas de la carcinogénesis (iniciación, promoción y progresión)	10
Figura 2.	
Estructura química de DEN	11
Figura 3.	
Metabolismo de las dialquilnitrosaminas.	12
Figura 4.	
Reparación por excisión de nucleótidos en el ADN.	14
Figura 5.	
<i>Calendula officinalis</i> L.	18
Tabla 1.	
Concentraciones de los extractos de <i>Calendula officinalis</i> que fueron genotóxicas y que protegieron al ADN contra el daño inducido por DEN.	36

LISTA DE GRÁFICAS.

	Página
Gráfica 1. Espectro de absorción de luz UV-visible de los extractos de <i>Calendula officinalis</i> .	37
Gráfica 2. Evaluación del daño al ADN producido por DEN en CPH.	38
Gráfica 3. Protección por el extracto CO-A del daño al ADN que produce DEN en CPH.	39
Gráfica 4. Protección por el extracto CO-H del daño al ADN que produce DEN en CPH.	40
Gráfica 5. Protección por el extracto CO-E del daño al ADN que produce DEN en CPH.	41
Gráfica 6. Protección por el extracto CO-C del daño al ADN que produce DEN en CPH.	42
Gráfica 7. Evaluación del daño al ADN producido por el extracto CO-A en CPH	43
Gráfica 8. Evaluación del daño al ADN producido por el extracto CO-H en CPH	44
Gráfica 9. Evaluación del daño al ADN producido por el extracto CO-E en CPH	45
Gráfica 10. Evaluación del daño al ADN producido por el extracto CO-C en CPH	46

RESUMEN.

Un sinnúmero de carcinógenos químicos dañan al ADN (genotóxicos), un ejemplo es la dietilnitrosamina (DEN), estas sustancias se encuentran presentes en el ambiente y estamos constantemente expuestas a ellas, sin embargo, en varios frutos y vegetales que ingerimos en la dieta, existen sustancias quimioprotectoras con actividades antimutagénicas y anticarcinogénicas, ejemplos son, las vitaminas A, C y E, los carotenoides, flavonoides, terpenoides, etc. Se ha demostrado la capacidad anticarcinogénica de algunos vegetales que se asumen como curativos en la medicina alterna, tal como el té verde obtenido de *Camelia sinensis* y el brocoli. Las flores de *Calendula officinalis* son utilizadas en la medicina tradicional como antiinflamatorio, antibacteriano, regenerador de epitelio entre otras propiedades y considerando que tiene componentes que en general se han identificado como antioxidantes, tales como saponinas, triterpenos, flavonoides entre otros, existe la posibilidad que por medio de estos componentes, al ingerir las flores de la planta o de sus extractos tengan un adecuado efecto en la quimioprotección contra el cáncer. El objetivo del presente trabajo fue determinar el efecto protector de extractos de *Calendula officinalis* contra el daño genotóxico provocado por DEN. Se utilizó como modelo de estudio el cultivo primario de hepatocitos (CPH), la genotoxicidad se midió por el análisis de la síntesis de ADN no programada (UDS) por medio de la incorporación de timidina tritiada (T^3H) al ADN durante su reparación, evitando la replicación con hidroxiaurea. La radioactividad se midió en un contador de centelleo, se cuantificó el ADN espectrofotométricamente por el método de la difenilamina, y los resultados se expresaron en desintegraciones por minuto (dpm) por μg de ADN. Los resultados también se expresaron en % de incorporación de T^3H respecto al control. Para conocer la capacidad protectora de *C. officinalis* se elaboraron 4 extractos de las flores; Un acuoso (CO-A), un hidroalcohólico (CO-H), un etanólico (CO-E) y un

clorofórmico (CO-C), en los últimos dos extractos se destiló el solvente y los sólidos restantes se disolvieron en dimetilsulfóxido (DMSO), en el CO-H se evaporó el etanol a temperatura no superior a 60°C y el CO-A fue preparado como una infusión.

Los resultados indican que DEN a 1.25µM presenta un efecto genotóxico máximo, incorporando T³H al ADN en un 40% más que el control. Los extractos se evaluaron solos y en combinación con el carcinógeno a 1.25µM. En combinación con el carcinógeno, los extractos CO-A, CO-E y CO-H impidieron totalmente el incremento en la incorporación de T³H al ADN que induce DEN a 1.25µM, los dos primeros extractos a concentraciones desde 0.02 hasta 0.8 µg de sólidos por ml de medio de cultivo y CO-H desde 0.0004 hasta 0.2 µg/ml, el extracto CO-C a 3.12 µg/ml redujo parcialmente la incorporación de T³H que induce DEN. Solo CO-A y CO-H fueron genotóxicos a concentraciones mayores a 25 y 1.23 µg/ml respectivamente, que corresponden a 1250 y 3075 veces más la concentración mínima con efecto protector. Suponemos, que los extractos tienen componentes en común con capacidad de proteger al ADN, los mecanismos de acción son diversos, pero consideramos que el que más se apega a nuestros resultados es el de la captura del metabolito genotóxico producido a partir de DEN, además de la posible propiedad antioxidante de los extractos. Los resultados nos permiten concluir que los extractos de las flores ligulares de *C. officinalis* L. contienen componentes aún no definidos capaces de proteger contra el daño que produce DEN al ADN en cultivos primarios de hepatocitos de rata.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 EL CÁNCER UN PROBLEMA MUNDIAL, SU DEFINICIÓN Y LAS CARACTERÍSTICAS DE SUS CÉLULAS.

El cáncer es un problema social para la humanidad, es la segunda causa de muerte después de las cardiopatías. En Estados Unidos las estadísticas revelan que una de cada cuatro personas morirá por cáncer, a pesar de que la mortalidad por neoplasias malignas ha disminuido sus tendencias crecientes en los últimos años (Wingo *y cols.*, 1998), sin embargo, en naciones del tercer mundo como México, está claro un patrón ascendente en las tasas de mortalidad por esta enfermedad. Esta diferencia está dada por factores que intervienen en la incidencia de cáncer como lo son: el sexo, edad, raza, dieta, costumbre, economía, ambiente, etc. y deben ser considerados para establecer las causas de estas enfermedades.

En México, desde 1990, el cáncer representa la segunda causa de muerte y en mujeres con más de 25 años, la primera. Los tumores malignos que se presentan con mayor frecuencia son el de cervix uterino, estómago, esófago, faringe e hígado, a diferencia de los países altamente desarrollados donde predominan los de mama, pulmón, próstata, colon y recto (Mohar *y cols.*, 1997). Tan solo en 1995 en México, fallecieron 48,222 personas a consecuencia del cáncer, equivalente a una tasa de 52.6 por cada 100,000 habitantes (Dirección General de Estadística e Informática de la Secretaría de Salud, México, 1997).

Independientemente del problema social que representa el cáncer, el descubrir los procesos que generan tumores malignos, ha despertado gran interés encaminado a comprender el funcionamiento de las células eucariontes de organismos pluricelulares.

El cáncer puede ser definido como *la alteración en los mecanismos que regulan la proliferación y especialización celular en organismos multicelulares*. Se han estudiado las características biológicas de las células cancerosas cuando son cultivadas y son las siguientes:

Inmortalización, es decir, se dividen ilimitadamente, mientras que las células normales cuando se cultivan, se dividen por varias generaciones y después sufren la llamada crisis de senescencia en la cual no se dividen más y mueren, sin embargo, algunas células pueden librar la crisis debido a cambios genéticos indefinidos y volverse inmortales, y son las que se denominan *líneas celulares*.

Decrecen los requerimientos de factores de crecimiento, a diferencia de las células normales que en cultivo se debe proveer de hormonas como la insulina y factores de crecimiento presentes en el suero bovino, algunas células malignas tienen capacidad de producir sus requerimientos para autoestimular su crecimiento (estimulación autócrina).

Cambian su morfología, adquiriendo formas más redondeadas al tener alterada la estructura celular, principalmente existen rupturas en los filamentos de actina, que es una proteína constitutiva del citoesqueleto.

Pierden la inhibición de crecimiento por contacto, por lo que se desarrollan en varias capas o estratos. El mecanismo que mantiene la inhibición por contacto no se conoce, pero se sabe que depende de la transmisión de señales entre células que anuncian su presencia a las vecinas, evitando así el crecimiento de estas una vez formada la monocapa confluyente.

Se hacen independientes al anclaje para crecer, mientras que las células normales a excepción de las hematopoyéticas se adhieren a superficies sólidas como el plástico formando una monocapa. La independencia al anclaje de las células tumorales indica que no requieren el mismo grado de estimulación externa que las células normales para mantener su estado de proliferación activa.

Crecen en animales inmuno-deprimidos, es decir, cuando se inoculan células transformadas en animales de laboratorio con el sistema inmuno deprimido, se forman neoplasias o masas tumorales.

Los tumores que ocurren en los seres vivos se han diferenciado en dos grandes grupos, benignos y malignos, las células de tumores benignos se encuentran delimitadas del tejido circundante, mientras que las células de tumores malignos o cáncer no forman una estructura definida, sino que tienen capacidad de atravesar la membrana basal del tejido original, llegar hacia el torrente sanguíneo o linfático e invadir y colonizar otros tejidos (metástasis). Las células de tumores benignos presentan características y funciones semejantes a las del tejido donde se originaron, sin embargo

representan un problema para las funciones del tejido normal, ya que ocupan un volumen excedente y secretan cantidades sobradas de sustancias con actividad biológica similar a las hormonas. Las células cancerosas están menos especializadas y con mayor cantidad de aberraciones cromosómicas que las de un tumor benigno, y se cree que existe progresión de las células tumorales benignas hacia malignas, sin embargo, la principal característica de un cáncer es la metástasis y para ello se requiere que las células cancerosas tengan las siguientes capacidades, 1) invadir células adyacentes y atravesar la matriz extracelular o membrana basal, 2) deben intravasarse, es decir, ingresar a vasos sanguíneos y/o linfáticos, 3) sobrevivir en la sangre o linfa y evadir la vigilancia inmune, 4) escapar de la circulación (extravasación), e 5) implantarse en un tejido extraño y formar un nuevo foco tumoral.

Las células transformadas, tienen un metabolismo anormal, de tal forma que incrementan el transporte de glucosa al interior de la célula, además elevan la actividad glucolítica anaerobia por lo que producen grandes cantidades de ácidos. En general, tienden a simplificar actividades metabólicas especializadas, e incrementan la síntesis de las sustancias necesarias para la división celular. Las células transformadas con capacidad de invadir secretan proteasas, incluidos varios tipos de colagenasas, heparanasa, estromelisina y la llamada activador de plasminógeno que favorece la formación de plasmina y permite la penetración de la células a la membrana basal y salir del tejido original.

Algunas células transformadas disminuyen la expresión de los antígenos HLA, lo que les permite eludir a los linfocitos citotóxicos en la respuesta inmune, ya que estos últimos, en condiciones normales colaboran en la identificación de células alteradas (Gerald y cols., 1996).

1.2 LA ETIOLOGÍA DEL CÁNCER TIENE COMO BASE LA MUTACIÓN GÉNICA.

El 90% de los cánceres es causado por factores ambientales que incluyen; *agentes físicos* como las radiaciones ionizantes y los rayos X, *agentes biológicos* infecciosos como los virus, y los *agentes químicos*. Independientemente de la etiología, la información acumulada en las últimas décadas sugirió que el fenotipo de las células transformadas tiene causa en la alteración del genoma celular, es decir, el ADN, de tal forma que actualmente se reconoce que la causa fundamental del cáncer es la mutación genética de las células somáticas.

Las mutaciones que provocan cáncer afectan a los genes responsables de la proliferación celular, la especialización de las células, la comunicación intercelular y otras actividades celulares fundamentales. Estos genes se han clasificado basándose en sus funciones en dos grupos; *oncogenes* y *genes supresores de tumor*. Los *oncogenes* son formas alteradas de genes normales, denominados *protooncogenes*, que participan en el control de la proliferación y diferenciación celular (Miller y cols., 1990), de tal forma que los oncogenes intervienen en la transformación maligna. Los *genes supresores de tumor* o anti-oncogenes, también intervienen en el ciclo celular, pero de modo contrario a los oncogenes bloquean la proliferación celular, de tal forma que la mutación en estos genes y su consecuente inactivación permite eliminar el freno en el crecimiento celular. Las oncoproteínas que son producto de la

sobreexpresión o la autonomía en la expresión de los oncogenes, participan en el control del crecimiento celular y son de cinco tipos; 1) Factores de crecimiento, 2) Receptores de factores de crecimiento, 3) Transductores de señal citoplasmática, 4) Factores de transcripción y 5) Proteínas que controlan el ciclo celular. Los oncogenes constituyen medios esenciales por los que las células transformadas adquieren independencia a los factores de crecimiento y la estimulación externa.

1.3 LAS SUSTANCIAS QUÍMICAS EN LA CARCINOGENESIS.

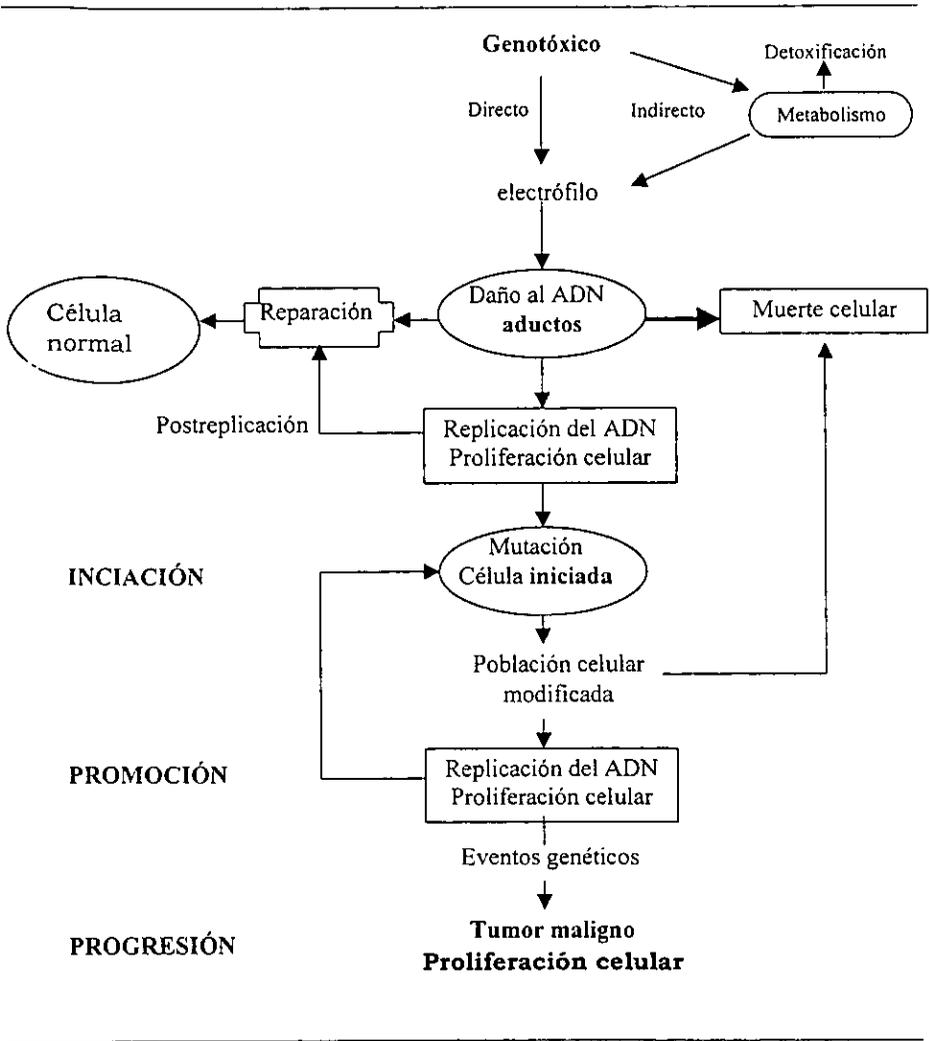
Actualmente, el ambiente está muy contaminado y saturado de compuestos químicos, se reconoce que los dos principales factores ambientales causantes de cáncer, son el fumar y los desequilibrios en la dieta, aproximadamente el 30% al 40% de todos los cánceres y el 90% de los cánceres de pulmón son atribuidos al humo del cigarro (Helzlsouer y cols., 1994), la contribución de la dieta en la inducción del cáncer es aún incierta, sin embargo se ha determinado que el consumo excesivo de grasas tiene relación directa con el cáncer. Algunas sustancias capaces de producir cáncer (carcinógenos) pueden producir alteración en el ADN (genotóxicos) tales como mutaciones puntuales, recombinaciones mitóticas, deleciones, aberraciones cromosómicas entre otras.

Los agentes genotóxicos han sido clasificados en *directos* e *indirectos*, son genotóxicos directos, cuando por hidrólisis o inestabilidad la molécula se activa adquiriendo capacidad para interaccionar con el ADN, mientras que los genotóxicos indirectos, requieren de la activación o transformación metabólica efectuada predominantemente en el hígado de los mamíferos, el metabolismo modifica la molécula haciéndola activa y más hidrosoluble con la intención de eliminarla. Los metabolitos activos que dañan al ADN son generalmente electrófilos (eléctricamente positivos), por lo que tienen capacidad de unirse al ADN y otras biomoléculas con carga negativa.

Algunos carcinógenos aparentemente no dañan al ADN y son conocidos como *carcinógenos no genotóxicos*, sin embargo tienen capacidad de inducir proliferación celular, lo que permite el establecimiento de mutaciones, es decir, al aumentar el número de células en división y la replicación del ADN, se incrementa la probabilidad de que ocurran alteraciones genéticas, además de que la disposición de reparación del ADN es menor, por lo que se fijan mutaciones.

La carcinogénesis ocurre en varias etapas y de acuerdo al proceso se han clasificado en *iniciación*, *promoción* y *progresión*. (Figura 1). La *iniciación* es el daño al ADN sufrido por una célula que se establece como mutación al ser permanente y heredable, si el ADN no se repara, la célula queda "iniciada" y con predisposición a más mutaciones. En la *promoción* ocurre una expansión clonal de la célula iniciada, en esta etapa se forma propiamente la neoplasia o tumor benigno (no invade otros tejidos). En la *progresión* se forman subpoblaciones genéticamente más aberradas y la neoplasia adquiere el carácter de tumor maligno con capacidad de metastatizar (escapa e invade otros tejidos) (Torroella y col., 1998).

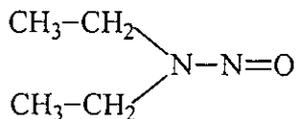
Figura 1. Etapas de la carcinogénesis (iniciación, promoción y progresión).



1.4 DIETILNITROSAMINA, UN CARCINÓGENO PRESENTE EN EL AMBIENTE

Entre los carcinógenos químicos conocidos, los indirectos representan la mayoría, además, se encuentran relativamente estables en el ambiente, un ejemplo es la dietilnitrosamina (DEN) también conocida como N-Nitrosodietilamina (NDEA) (Figura 2), ha sido utilizada extensamente en modelos de carcinogénesis, existe evidencia de la exposición del ser humano con este carcinógeno y su relación con el cáncer, se ha encontrado en el humo del tabaco, en el agua, en alimentos como la carne, bebidas alcohólicas como el whisky, etc., (Verna y cols., 1996), (IARC, 1978).

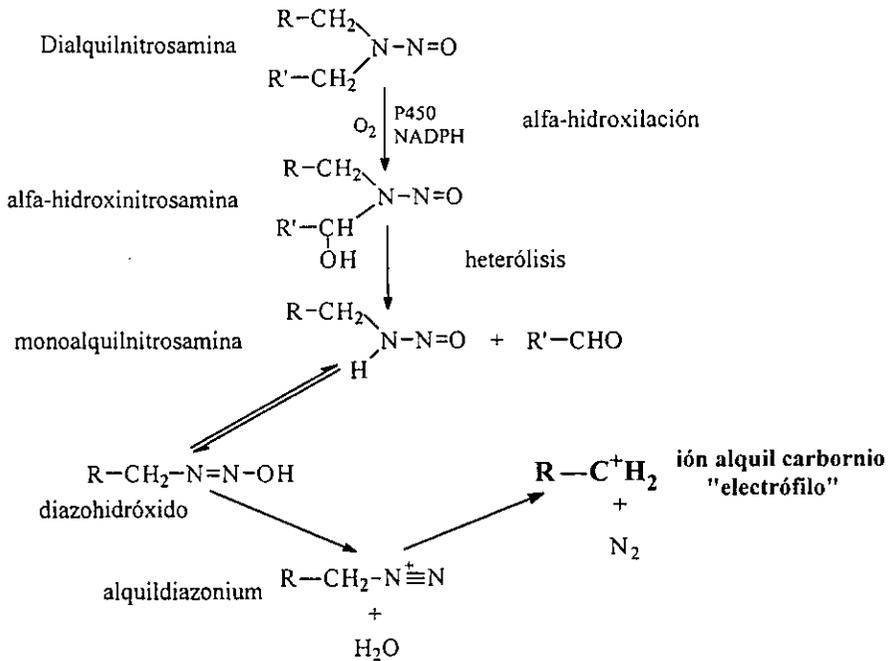
Figura 2. Estructura química de DEN



El mecanismo de acción de DEN al igual que otros carcinógenos, es el de la alquilación del ADN, es decir, los agentes alquilantes como las dialquilnitrosaminas en el metabolismo producen iones alquil carbonio (figura 3) que se unen a las bases del ADN formando *aductos*. DEN es metabolizada principalmente por la enzima CYP2E1 en el citocromo P450, el metabolito activo producido es el ión etil carbonio, este etila al ADN substancialmente en el grupo fosfato, produciendo ruptura en la cadena,

sin embargo, la reparación es más eficiente, la etilación de las bases del ADN pueden producir mutaciones, la mayor cantidad de aductos son el etil-guanina en las posiciones O⁶ y N⁷ y el etil-timina en las posiciones O² y O⁴ (Verna y cols., 1996). Se ha comprobado que los aductos O⁶-etil-guanina y el O⁴-etil-timina en el ADN conducen a mutaciones por sustitución de bases, además de que la formación de O⁶-alquilguaninas se ve favorecido cuando el ADN esta en replicación (Loveless, 1979).

Figura 3. Metabolismo de las dialquilnitrosaminas.



1.5 LA REPARACIÓN DEL ADN EN LA CARCINOGENÉISIS.

El ADN de las células de los mamíferos está constantemente expuesto al daño, ya sea *exógeno* por xenobióticos genotóxicos o *endógeno* por sustancias como las especies reactivas de oxígeno (ROS), que tienen funciones determinadas, por lo que, las células han desarrollado mecanismos antioxidantes, uno de los más importantes son los de la reparación del ADN. Los mecanismos de reparación del ADN en las células eucariontes son diversos, complejos e indispensables para la supervivencia, el más estudiado por que también ocurre en procariontes como *Escherichia coli*, es el de reparación por excisión (Figura 4), en el cual una endonucleasa reconoce la base alterada (aducto) y corta la cadena en ambos extremos del daño incluyendo bases no alteradas, posteriormente una exonucleasa remueve el fragmento escindido y por medio de una ADN polimerasa se sintetiza el ADN faltante, finalmente una ligasa retira el corte uniendo la cadena.

La reparación del ADN juega un papel importante en el proceso de carcinogénesis, por que puede prevenir la iniciación, sin embargo, si la proliferación celular es activada o incrementada, el tiempo para reparar el ADN decrece, además la reparación es inefectiva o defectuosa y la oportunidad de presentarse células iniciadas se incrementa (IARC, 1992).

Existen enfermedades hereditarias como el *Xeroderma pigmentosum*, la anemia de Fanconi, el síndrome de Bloom, la ataxia telangiectasia, etc.,

en la cual la característica común es la deficiencia en la reparación del ADN, y la susceptibilidad a desarrollar tumores.

Figura 4. Reparación por excisión de nucleótidos en el ADN. (Reproducido de GENES VI, Lewin 1997).

Reparación del ADN por excisión de nucleótidos



ADN intacto



Daño al ADN.
Formación de
aductos



Corte en ambos
extremos del
aducto
Fragmento de
ADN escindido



Síntesis de ADN
no programada



Unión de la
cadena de ADN

1.6 LA QUIMIOPROTECCIÓN REDUCE EL RIESGO AL CÁNCER.

El hombre en toda su existencia ha estado expuesto a diversos carcinógenos, sin embargo, por medio de la dieta se ha protegido sin tener conocimiento de ello, es decir, diversos frutos y vegetales entre otros alimentos naturales contienen sustancias capaces de bloquear la acción de los carcinógenos, por lo tanto podemos hablar de un equilibrio natural carcinógeno-anticarcinógeno. Actualmente la contaminación, la ingestión de alimentos no naturales y el incremento en el hábito de fumar, han roto dicho equilibrio natural, de tal forma que la exposición a carcinógenos químicos se ha incrementado. En las décadas anteriores se ha trabajado incesantemente en la identificación de carcinógenos y se sugirió tomar precauciones y evitar la exposición a ellos para reducir el riesgo al cáncer, por ejemplo, si se dejara el hábito de fumar en la población, la incidencia de cáncer se reduciría en un alto porcentaje, esto no ha sido posible y se han buscado alternativas que protejan contra la acción de los carcinógenos. La *quimioprotección* puede ser una alternativa, se ha definido como el uso de sustancias naturales o sintéticas capaces de prevenir la ocurrencia de lesiones precancerosas o bien para retardar o revertir la progresión de padecimientos clínicamente establecidos (Buiatti, 1997).

Ciertos componentes de los alimentos son una fuente importante de sustancias capaces de inhibir la carcinogénesis. Los vegetales y frutas proveen componentes antioxidantes que disminuyen el riesgo al cáncer

(Helzlsouer y cols., 1994). En estudios experimentales, se han identificado algunos agentes que ejercen protección contra el cáncer, por ejemplo, la vitamina A (retinol y sus análogos) son capaces de suprimir carcinógenos inductores de la transformación celular además de inhibir el crecimiento de células tumorales (Huang, 1987), (Man y cols., 1998), la vitamina C (ácido ascórbico) tiene importantes actividades antioxidantes de repercusión en carcinogénesis (Helzlsouer y cols., 1994), la vitamina E (tocoferol) es un potente antioxidante capaz de inhibir la acción de diversos carcinógenos (Hirose y cols., 1993), el β -caroteno y muchos carotenoides tienen capacidad de inhibir carcinógenos del humo del cigarro además de tener propiedades antitumorales (Man y cols., 1998), (Mathews, 1982). Diversos polifenoles como flavonoides (Asad y cols., 1998), taninos, ácido cafeico, etc., fármacos como la aspirina (Helzlsouer y cols., 1994) y el oltipraz, entre otros, han demostrado por diferentes mecanismos de acción la capacidad de bloquear el efecto de múltiples carcinógenos y ésto ha generado un notable interés en el campo alimenticio y farmacológico.

En muchas investigaciones se ha demostrado la capacidad anticarcinogénica de los componentes de algunos vegetales descritos como curativos en la medicina tradicional, tal como el té verde obtenido de *Camelia sinensis* que contiene al anticarcinógeno (apigallo catechin gallato), el broccoli que contiene un antígenotóxico (sulforafano) (Barcelo y cols., 1996), el ácido ellágico presente en el ajo (Akagi y cols., 1995). Algunos otros vegetales muestran actividades anticarcinogénicas pero no

se ha descrito el componente activo, tal es el caso de los extractos de *Ocimum sanctum* que evita la unión del carcinógeno al ADN (Prashar y cols., 1998), los extractos de las flores de *Hibiscus sabdariffa* protegen contra el estrés oxidativo en hepatocitos de rata (Tseng y cols., 1997), entre otras. Sin embargo, existe una gran diversidad de vegetales con potencial anticarcinógeno, y pueden ser explotados en la quimioprotección contra el cáncer si se investigan sus propiedades biológicas.

1.7 LAS FLORES DE *Calendula officinalis* L, TIENEN MÚLTIPLES PROPIEDADES FARMACOLÓGICAS.

Calendula officinalis L., es conocida en México como "Mercadela" (Figura 5) y es considerada una planta decorativa, se cultiva con propósitos ornamentales, alimenticios (como condimento y colorante en sustitución del azafrán) y medicinales, *C. officinalis* pertenece a un grupo de plantas con flores compuestas, como la margarita, el crisantemo, la flor de muerto entre otras.

Figura 5. *Calendula officinalis* L.



C. officinalis ha sido utilizada durante mucho tiempo en la medicina tradicional y se le han atribuido más de 35 propiedades a las infusiones y tinturas de las flores, por ejemplo, antiinflamatorio, analgésico, antitumoral, antiúlceras, diurético, bactericida, y curativo en heridas de la piel, entre otras. Algunos experimentos farmacológicos han demostrado propiedades; bactericida (Dumenil y cols., 1980), antiviral, antiinflamatoria (Della-Loggia y cols., 1994), antiedema (Zitterl-Eglseer y cols., 1997),

analgésica, antitumoral, donde se probó que extractos de hojas de la planta, tenía propiedad citotóxica en tres líneas celulares; MRC5, Hep2 y células ascíticas del carcinoma de Ehrlich (Boucaud-Maitre y cols., 1988), regeneradora de epitelio (Klouček-Popova y cols., 1982), antimutagénica (Elias y cols., 1990), etc. Se ha evaluado la genotoxicidad de un extracto hidroalcohólico 60% (v/v) de las flores, exhibiendo toxicidad dosis-dependiente y genotoxicidad en la prueba de segregación mitótica de *Aspergillus nidulans*, sin embargo, fue negativa para la prueba de Ames con las cepas de *Salmonella* TA 1535, TA 1537, TA 98 y TA 100 (\pm S9) a concentraciones de 50 a 500 μ g/placa, mientras que a dosis de 1g/Kg bw por dos días para la prueba de micronúcleos en médula ósea de ratón también fue negativa. (Ramos y cols., 1998).

Se han identificado algunos componentes lipofílicos activos de las flores de *C. officinalis*, como las saponinas, con propiedades antimutagénicas, triterpenos alcohólicos con propiedad antiinflamatoria y antiedematosa, glicósidos de flavonol (Pietta y cols., 1992) con posibles propiedades anticarcinogénicas (Asad y cols., 1998).

1.8 LOS CULTIVOS PRIMARIOS DE HEPATOCITOS (CPH) SON ÚTILES PARA ESTUDIAR LA CARCINOGENESIS.

El cultivo primario de hepatocitos (CPH) de rata, ha sido utilizado en diversos estudios de carcinogénesis química en las últimas décadas, las razones son: 1) la capacidad de metabolizar una gran variedad de carcinógenos químicos, 2) tienen reparación de ADN eficiente, lo que permite medirlo y utilizarlo como parámetro genotóxico de los carcinógenos, 3) el proceso de aislamiento de hepatocitos, permite eliminar la heterogeneidad celular, 4) control de la concentración en el medio de cultivo de las sustancias a evaluar, a diferencia de los estudios *in vivo* donde la dosis administrada sufre dilución en otros órganos, 5) al ser cultivos primarios, ofrecen características similares a los hepatocitos *in situ* y 6) ofrecen gran reproducibilidad en los resultados, ya que el comportamiento de los hepatocitos recién cultivados es muy homogéneo.

Los CPH, tienen como desventaja, la baja o nula proliferación celular, a menos que se realice una hepatectomía parcial previa al cultivo, en casos de estudios de transformación celular, el periodo es más prolongado que en otras células, además se requiere de mayor exposición a los carcinógenos para transformarse.

1.9 EL ANÁLISIS DE LA SÍNTESIS DE ADN NO PROGRAMADA (UDS), PERMITE MEDIR EL POTENCIAL GENOTOXICO

La toxicología genética cuenta con diversas estrategias que determinan y miden la capacidad de los xenobióticos para dañar al ADN, uno de los análisis importantes que permite estudiar genotóxicos en células sin proliferación, es el de UDS por sus siglas en ingles (Uncheduled DNA Syntesis) que se refiere a la síntesis de ADN no pertinente a la replicación, es decir, a diferencia de otras pruebas genético-toxicológicas no se requiere de la replicación del ADN en las células para que se produzca daño, además el UDS realizado en CPH adquiere mayores ventajas. El análisis por UDS tiene como fundamento que el daño genotóxico en una célula viable induce reparación y si se proporciona timidina tritiada (T^3H) esta se incorporará durante la síntesis al ADN (Síntesis de ADN no programada). Para garantizar que la incorporación de T^3H no corresponda a la replicación del ADN (síntesis programada de ADN), se añade al sistema hidroxurea (inhibidor de la replicación). Por lo que el daño genotóxico es proporcional a la reparación medida por la incorporación de timidina tritiada (T^3H) (cuantificada en un contador de centelleo) en el ADN.

2. OBJETIVOS

Objetivo general:

- Determinar *in vitro* el efecto de extractos de *Calendula officinalis* contra el daño genotóxico provocado por dietilnitrosamina.

Objetivos específicos:

- Elaborar extractos de *Calendula officinalis* para ser evaluados en cultivos primarios de hepatocitos (CPH).
- Determinar la concentración de dietilnitrosamina (DEN) que produce efecto genotóxico en CPH de rata por análisis de la síntesis de ADN no programada (UDS), como monitor para analizar el efecto de los extractos de *C. officinalis*.

3. HIPÓTESIS:

Los diferentes extractos a probar de *Calendula officinalis* previenen el efecto genotóxico provocado por DEN en cultivo primario de hepatocitos de rata.

2. OBJETIVOS

Objetivo general:

- Determinar *in vitro* el efecto de extractos de *Calendula officinalis* contra el daño genotóxico provocado por dietilnitrosamina.

Objetivos específicos:

- Elaborar extractos de *Calendula officinalis* para ser evaluados en cultivos primarios de hepatocitos (CPH).
- Determinar la concentración de dietilnitrosamina (DEN) que produce efecto genotóxico en CPH de rata por análisis de la síntesis de ADN no programada (UDS), como monitor para analizar el efecto de los extractos de *C. officinalis*.

3. HIPÓTESIS:

Los diferentes extractos a probar de *Calendula officinalis* previenen el efecto genotóxico provocado por DEN en cultivo primario de hepatocitos de rata.

4. MATERIALES.

4.1 REACTIVOS:

Material	Proveedor
Colagenasa tipo IV, con actividad de digestión de colagena = 398U/mg. Hidroxiurea (HU) Dietilnitrosamina (DEN) Tris-HCl	Sigma Chemical CO.
Dimetilsulfoxido (DMSO) Ácido perclórico (PCA) Difenilamina Fosfatos de sodio NaCl CaCl ₂	Merck CO.
Medio mínimo esencial (MEM) con sales de Earle's L-glutamina	Gibco BRL.
Suero de ternera	HyClone Lab, Inc.
Timidina tritiada (6- ³ H) Thymidine con actividad de 22-23 Ci/mmol	Amersham Life Science.
Insulina humana R (ADN recombinante)	Ely Lilly (México).
El liquido de centelleo (Ready Safe for aqueous samples) fue obtenido de	Bckman.

4.2 BIOLÓGICOS.

Se utilizaron ratas Wistar macho de 180-200 g de peso alimentadas *ad libitum* en el bioterio del CINVESTAV.

4.3 SOLUCIONES:

1. **PBS** (K₂HPO₄/KH₂PO₄ 15mM; NaCl 0.15M pH 7.4)
2. **FTR-sulfato** (Flat-to-round solution); NaCl 140mM, NaHCO₃ 40mM, Ácido cítrico 5mM, 0.225M Na₂SO₄.
3. **EGTA 0.5mM**, (NaCl 137mM, KCl 50mM, Na₂HPO₄ 0.4mM, Trizma base 25mM y rojo de fenol 0.001%).
4. **CaCl₂ 2.5mM**, (NaCl 137mM, KCl 50mM, Na₂HPO₄ 0.4mM, Trizma base 25mM y rojo de fenol 0.001%).
5. **Difenilamina** (1.5g de difenilamina en 100ml de ácido acético glacial y 1.5ml H₂SO₄).

5. METODOLOGÍA

5.1 OBTENCIÓN DE LAS FLORES DE *Calendula officinalis* L.

En Febrero de 1998 se realizó un cultivo de la planta, sembrando cepellones en una area de 100m² en F.E.S.-Cuautitlán campo-4. En los meses de mayo a agosto se recolectaron las flores ligulares desarrolladas, se lavaron y se secaron a temperatura ambiente cubiertas de la luz.

5.2 OBTENCIÓN DE LOS EXTRACTOS.

Se realizaron los siguiente extractos, un acuoso, un hidroalcohólico, un etanólico y un clorofórmico, con el fin de evaluar de manera general en 4 grandes grupos la mayor gama de componentes de las flores de *Calendula officinalis*.

- Extracto acuoso (CO-A)

Justificación; Obtener los componentes más polares o hidrosolubles.

Procedimiento; Se realizó una infusión (15g de flores secas en un litro de agua desionizada), es decir, se hirvió el agua y se adicionó la muestra durante 15 minutos, se retiraron los sólidos con un filtro de papel, el filtrado se esterilizó con una membrana con poro de 0.22µm y se determinó su concentración basándose en el peso seco siendo de 6.72mg de sólidos/ml.

- Extracto hidroalcohólico (CO-H)

Justificación; La obtención de flavonoides, terpenoides, entre otros componentes solubles en soluciones hidroalcohólicas.

Procedimiento; Se extrajo el marco de componentes con etanol al 96%, (5g de muestra seca por cada 0.5 litros de etanol) en agitación por tres días, posteriormente se agregaron 0.5 litros de agua destilada, se filtró para retirar los sólidos, se evaporó del filtrado principalmente el etanol a temperatura no superior a 55°C hasta que restó un volumen aproximado de 0.4 litros. El extracto se esterilizó por filtración con una membrana con poro de 0.22µm. La concentración del extracto fue de 4.54mg de sólidos por ml de una solución hidroalcohólica al 0.8% de etanol (w/v), la determinación de la concentración de etanol se realizó en un Cromatógrafo de Gases (HP4890D) adaptado a un Headspace Sampler (HP7694E).

- Extracto etanólico (CO-E).

Justificación; Obtener la gama de componentes que incluye desde los compuestos hidrosolubles hasta los liposolubles.

Procedimiento; 15g de muestra seca en un litro de etanol absoluto se dejó en agitación por tres días a temperatura ambiente protegido de la luz, se retiró lo insoluble por filtración, la solución se sometió a destilación a presión reducida con temperatura no superior a 60°C hasta sequedad. Los sólidos restantes se pesaron y se disolvieron en dimetilsulfoxido DMSO, los que fueron de 19.2 mg de sólidos del extracto/ml. Los residuos de etanol correspondieron a 0.34% (w/v), esta determinación se realizó en

un Cromatógrafo de Gases (HP4890D) adaptado a un Headspace Sampler (HP7694E).

- Extracto clorofórmico (CO-C).

Justificación; Obtener la gama de componentes no polares o liposolubles.

Procedimiento; El mismo que para el extracto CO-E pero se utilizó cloroformo en lugar de etanol. Los sólidos resultantes se pesaron y se disolvieron en DMSO y fueron de 10 mg de sólidos por ml. Los residuos de cloroformo no se determinaron.

5.3 ESPECTROSCOPIA DE LOS EXTRACTOS

Con la intención de tener un patrón que permitiera comparar los diferentes extractos se examinaron los espectros de absorción de luz UV-visible, para lo cual se diluyeron a una concentración de 225 µg de sólidos por ml, en agua desionizada para los extractos CO-A y CO-H y en DMSO los extractos CO-E y CO-C, los blancos fueron agua y DMSO según el extracto a evaluar, las lecturas de absorción de luz se registraron desde 200nm a 800nm en un espectrofotómetro (BECKMAN DU7500). Gráfica 1.

5.4 CULTIVO PRIMARIO DE HEPATOCITOS (CPH) DE RATA

Ratas Wistar machos con ayuno de 18 a 20 h, a las cuales se le hizo una perfusión hepática *in situ* con colagenasa (Seglen, 1976), (Berry y cols., 1969) fueron la fuente de los hepatocitos. En forma resumida se siguió el siguiente procedimiento; los animales se anestesiaron con éter

etilico, se aplicó asepsia, se realizó una laparotomía y se desplazaron los intestinos para dejar al descubierto la vena porta, ésta se canuló con una aguja calibre 18 conectada a una bomba peristáltica. Primero se pasó, en condiciones de esterilidad, una solución de EGTA 0.5mM a 37°C durante 4 minutos con una velocidad de flujo de 15ml/min, al inicio de la perfusión se cortó la vena cava a la altura de los riñones para permitir la salida de los fluidos y posteriormente se introdujo una solución de colagenasa tipo IV (16mg/70ml) y CaCl₂ 2.5mM a 37°C a una velocidad de 9ml/min durante el tiempo necesario para que el hígado perdiera su consistencia dura. El hígado se extrajo, se colocó en una caja petri (10cm), se añadieron aproximadamente 30ml de medio mínimo esencial (MEM) para disgregarlo mecánicamente, la suspensión celular se colocó en un tubo cónico para lavar las células, se centrifugó a 500rpm/1min, se desechó el sobrenadante, se adicionó nuevamente MEM y la operación de lavado se repitió una vez más. Las células se suspendieron en medio completo (MEM con 10% de suero de ternera e insulina 15UI/100ml), se determinó la concentración celular con un hematocitómetro y se examinó la viabilidad celular por el criterio de la exclusión de azul de tripano al 0.05%. Se sembraron 8×10^5 hepatocitos por 1.5 ml de medio completo en cajas de 35mm. Se permitió la adhesión celular de 1h a 2h a 37°C, con atmósfera húmeda con CO₂ al 5%. Las células de los cultivos realizados tuvieron una viabilidad superior al 80%.

5.5 DAÑO GENOTÓXICO EN CPH. MÉTODO DE SÍNTESIS DE ADN NO PROGRAMADA (UDS).

(Mitchell y cols., 1983) (Swierenga y cols., 1991).

PROCEDIMIENTO.- Posterior al periodo de adhesión celular en el CPH, se retiró el medio por aspiración y se agregó 1ml de MEM libre de suero, conteniendo; insulina 15UI/100ml, hidroxIUrea (HU) 76mg/100ml, T³H 4.3µCi/ml y uno o varios de los siguientes tratamientos.

Control.- DMSO (10µl/ml medio) para los experimentos donde se evaluaron los extractos (CO-E y CO-C).

DEN.- DEN (0.625, 1.25, 2.5, 5 y 10 µM) para determinar la genotoxicidad del carcinógeno.

Extractos.- Extractos en cantidades variables.

Extractos + DEN.- Extractos en cantidades variables en medio con DEN a 1.25µM.

Control de DEN. DEN a 1.25µM adicionado con DMSO (10µl/ml medio) para los experimentos donde se evaluaron los extractos (CO-E y CO-C).

Las células se incubaron durante 4h a 37°C, con atmósfera húmeda con CO₂ al 5%. Posteriormente se retiró el medio de tratamiento y se lavaron las células con PBS (pH 7.4).

5.6 PROCESO PARA EXPRESAR LA INCORPORACIÓN DE T³H EN FUNCIÓN DE LA CANTIDAD DE ADN (Leyva y cols., 1974).

Después de lavadas las células, se despegaron por fuerza iónica con una solución hipertónica FTR (Flat-to-round solution) (Sit y cols., 1991), se transfirieron a tubos Eppendorf (1.5ml) y se retiró la solución FTR por centrifugación (Ultracentrifuga Brinkmann 5412) a 7,500 rpm durante 2min, las células fueron resuspendidas en 500µl de Tris-HCl 10 mM, se sonicó (Ultrasonic FS5) durante 5 minutos para producir lisis celular, se precipitaron las macromoléculas por la adición de 500µl de ácido perclórico (PCA) 0.4M y se refrigeró a 4°C durante 1h, posteriormente se centrifugó durante 2min a 7,500rpm y se desechó el sobrenadante, para hidrolizar el ADN se resuspendió la pastilla con 250µl de PCA 1M y se calentó a 70°C durante 1h, cuando se enfriaron los tubos, se centrifugó 2' a 10,000 rpm y 200µl del hidrolizado (sobrenadante) se colocaron en otro tubo Eppendorf y se adicionaron 200µl de cromóforo (Solución en ácido acético glacial de difenilamina, que se une específicamente a la desoxiribosa de los nucleósidos producidos por la hidrólisis del ADN, por lo que la mezcla de reacción desarrolla color azul) y se incubó a 37°C durante 18h. Se midió la absorbencia de la mezcla de reacción a 600nm en un espectrofotómetro (BECKMAN DU7500).

La concentración de ADN de cada tubo se determinó interpolando en una curva estándar de ADN de timo de ternera, con los siguientes parámetros:

Absorbencia = $26.45 (\mu\text{g de ADN}/\mu\text{l de mezcla de reacción}) + (-0.006)$

Coeficiente de correlación $r = 0.9902$

Para determinar la T³H incorporada al ADN, 200 μl de la mezcla de reacción (equivalente a 100 μl de hidrolizado) se colocaron en un vial al cual se le adicionaron 3ml de líquido de centelleo y se midieron las desintegraciones por minuto (dpm) en un contador de centelleo (BECKMAN LS-600 SC).

5.7 PROCESAMIENTO DE LOS DATOS.

Se calcularon las dpm del total del ADN (250 μl de hidrolizado) y se dividieron entre el ADN (μg) total, reportándose finalmente en dpm/ μg de ADN, los resultados adicionalmente se expresaron en % de incorporación de T³H respecto al control (considerando la incorporación basal como 0%). Ya que la incorporación de T³H en el ADN es debido a su reparación las dpm/ μg de ADN son proporcionales al daño genotóxico.

5.8.1 DETERMINACIÓN DEL POTENCIAL GENOTÓXICO DE DEN EN CPH.

Para confirmar el potencial genotóxico de DEN se planteó el siguiente experimento.

Experimento 1. Realizar un CPH y someter las células a las siguientes concentraciones de DEN (0.625, 1.25, 2.5, 5 y 10 μM) y comparar con la incorporación de T³H basal. Gráfica 2

5.8.2 DETERMINACIÓN DEL EFECTO GENOTÓXICO DE DEN EN COMBINACIÓN CON LOS EXTRACTOS CO-(A, H, E Y C) EN CPH.

Para conocer la capacidad de protección al ADN (del daño que produce DEN) por parte de los extractos, se sometió a los hepatocitos a la concentración más genotóxica (1.25 μ M) de DEN (ver Gráfica 2) en combinación con los extractos y se comparó con la incorporación de T³H basal y la que produce exclusivamente DEN, para ello se plantearon los siguientes experimentos:

Experimento 2. Concentraciones variables del extracto CO-A en combinación con DEN. (Gráfica 3)

Experimento 3. Concentraciones variables del extracto CO-H en combinación con DEN. (Gráfica 4)

Experimento 4. Concentraciones variables del extracto CO-E en combinación con DEN. (Gráfica 5)

Experimento 5. Concentraciones variables del extracto CO-C en combinación con DEN. (Gráfica 6)

5.8.3 DETERMINACIÓN DEL POTENCIAL GENOTÓXICO DE LOS EXTRACTOS CO-(A, H, E Y C) EN CPH.

Para conocer la capacidad de dañar al ADN de los extractos y comparando con la incorporación de T³H basal se plantearon los siguientes experimentos:

- Experimento 6. Concentraciones variables del extracto CO-A. (Gráfica 7)
- Experimento 7. Concentraciones variables del extracto CO-H. (Gráfica 8)
- Experimento 8. Concentraciones variables del extracto CO-E. (Gráfica 9)
- Experimento 9. Concentraciones variables del extracto CO-C. (Gráfica 10)

Para cada experimento se realizó un CPH usando una rata. Los tratamientos de cada experimento se hicieron por triplicado y se procesaron individualmente, por lo que en los resultados, se muestra el promedio de cada tratamiento.

6. RESULTADOS.

6.1 GENOTOXICIDAD DE LA DIETILNITROSAMINA (DEN)

En la Gráfica 2, se muestra el efecto genotóxico que produce DEN. En todas las concentraciones evaluadas (0.625, 1.25, 2.5, 5, 10 μM) se incorporó mayor cantidad de T^3H (medida en dpm) por μg de ADN que en el tratamiento control. La concentración 1.25 μM fue la que produjo mayor incorporación de T^3H al ADN, siendo 40% mayor al control.

6.2 PROTECCIÓN AL ADN DE LA GENOTOXICIDAD DE DEN POR LOS EXTRACTOS.

En la Gráfica 3, se muestra el efecto del extracto CO-A sobre el daño al ADN que produjo DEN 1.25 μM . El mayor efecto protector se encontró desde 0.02 $\mu\text{g}/\text{ml}$ hasta 0.8 μg de sólidos del extracto por ml, ya que la incorporación de T^3H , que representa el daño al ADN fue menor (-20%) incluso que la incorporación del control.

El extracto CO-H, desde 0.4ng/ml hasta 1.6ng de sólidos /ml (no μg), inhibió totalmente el daño al ADN que produce DEN (Gráfica 4). Concentraciones superiores a 1.6ng/ml hasta 200ng/ml protegieron parcialmente contra DEN.

La protección al ADN del daño que produce DEN por el extracto CO-E (Gráfica 5), fue total cuando se evaluaron las concentraciones desde 0.02 μg hasta 1.6 μg de sólidos del extracto por ml de medio con DEN a la concentración genotóxica de 1.25 μM .

En la Gráfica 6, se muestra el efecto genotóxico de DEN $1.25\mu\text{M}$ en combinación con el extracto CO-C, la concentración que mayor efecto protector tuvo fue a $3.12\mu\text{g}$ de sólidos del extracto por ml, reduciendo a la mitad la incorporación de T^3H al ADN inducida por el carcinógeno. Otras concentraciones no tuvieron mejor efecto.

6.3 GENOTOXICIDAD DE LOS EXTRACTOS DE *Calendula officinalis* L.

El extracto acuoso (CO-A), produjo una incorporación de T^3H al ADN por encima de la incorporación del control a concentraciones superiores a $25\mu\text{g}$ de sólidos por ml de medio de cultivo (Gráfica 7), y a estas concentraciones presentó una correlación directa (daño al ADN/concentración), de tal forma que una concentración de $100\mu\text{g/ml}$ produjo 40% más incorporación de T^3H al ADN que el control. Concentraciones menores a $12.5\mu\text{g/ml}$ hasta $0.006\mu\text{g/ml}$, no indujeron una incorporación de T^3H al ADN mayor que en el control.

En la Gráfica 8, se ve el efecto del extracto hidroalcohólico (CO-H) sobre la incorporación de T^3H al ADN, a concentraciones superiores de $1.23\mu\text{g/ml}$ este efecto se incrementó, y fue directamente proporcional a la concentración, con un máximo de incorporación de T^3H de 43% referente al control a una concentración de $100\mu\text{g/ml}$. Concentraciones menores a $0.41\mu\text{g}$ de sólidos de extracto/ml no mostraron este efecto.

En la Gráfica 9, se muestra el efecto que tuvo el extracto etanólico (CO-E) en el CPH, se evaluaron concentraciones desde $0.024\mu\text{g}$ de sólidos/ml hasta $100\mu\text{g/ml}$, y en ninguna se presentó una inducción de la

incorporación de T³H al ADN superior al control, además las concentraciones desde 0.1µg/ml hasta 12.5 µg/ml, mostraron una incorporación de T³H al ADN menor que el control.

Se puede inferir de estos experimentos que el extracto clorofórmico (CO-C), al igual que el extracto CO-E no fue genotóxico (Gráfica 10), se evaluaron concentraciones desde 0.78µg/ml hasta 50µg de sólidos de CO-C/ml, y ninguna superó la incorporación de T³H al ADN que mostró el control.

6.4 RESUMEN DE LOS EFECTOS DE LOS EXTRACTOS DE *Calendula officinalis* L. TABLA 1.

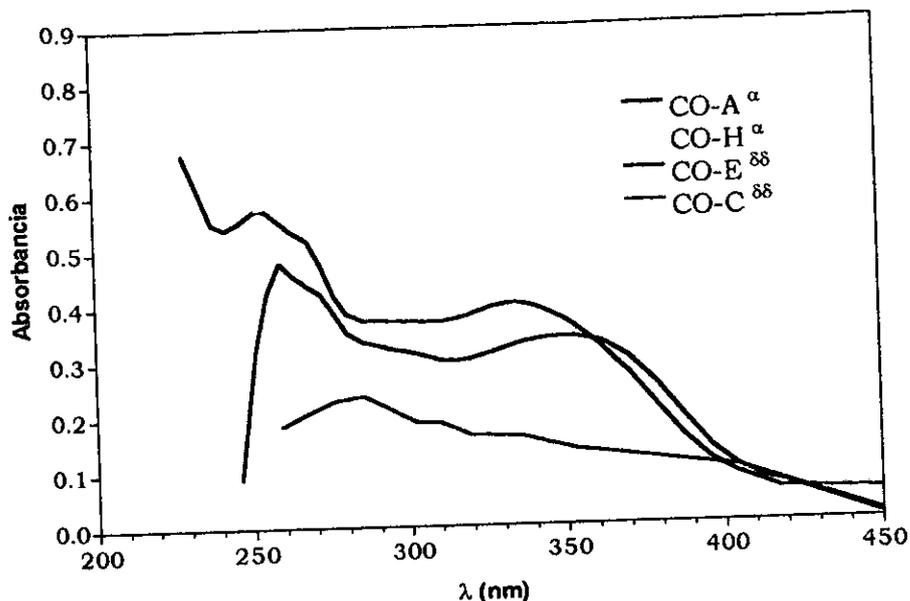
Tabla 1. Concentraciones de los extractos de *Calendula officinalis* que fueron genotóxicas y que protegieron contra el daño inducido por DEN.

Extracto	Intervalo evaluado	Genotóxicidad (CG)	Concentración mínima que protege contra DEN completamente (CP)
CO-A	0.005 - 100 (µg/ml)	> 25 § (µg/ml)	0.02 § - 0.8 (µg/ml)
CO-H	0.0002 - 100 (µg/ml)	> 1.23 † (µg/ml)	0.0004 † - 0.2 (µg/ml)
CO-E	0.01 - 100 (µg/ml)	No genotóxico	0.02 - 1.6 (µg/ml)
CO-C	0.78 - 50 (µg/ml)	No genotóxico	3.12 µg/ml

§ CG fue 1250 veces superior que CP.

† CG fue 3075 veces superior que CP.

Espectro de absorción de luz UV-visible de los extractos^ψ de *Calendula officinalis*



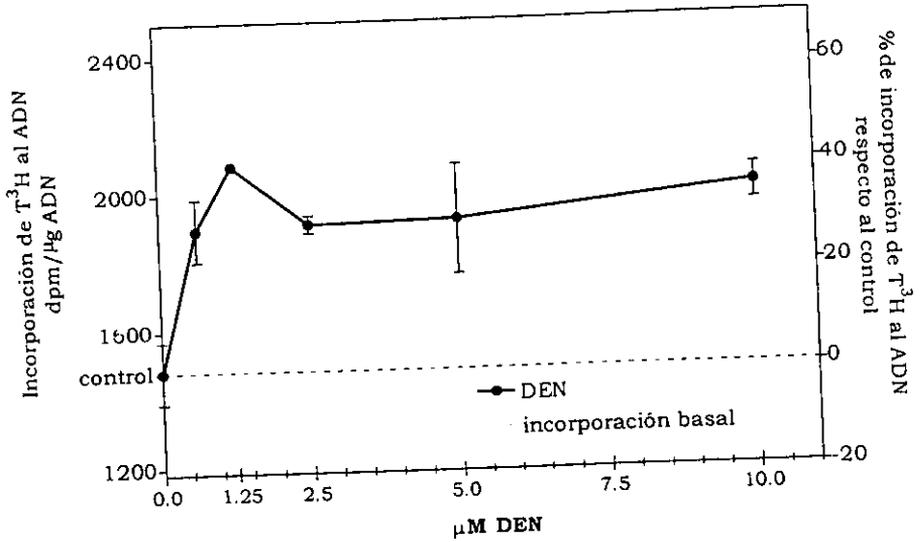
Gráfica 1.- Espectros de absorción de luz UV-visible de los extractos de *Calendula officinalis* L. Ningún extracto absorbió luz visible en las longitudes de onda (λ) desde 400 hasta 800 nm.

^ψ La concentración de los extractos fue 225 μg de sólidos /ml.

^α Extracto disuelto en agua.

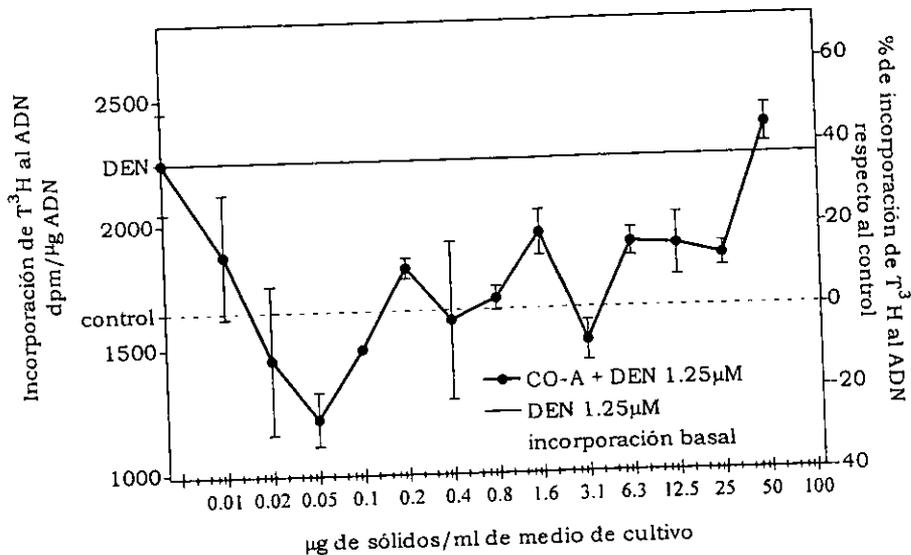
⁸⁸ Extracto disuelto en DMSO.

Evaluación del daño al ADN producido por DEN en CPH



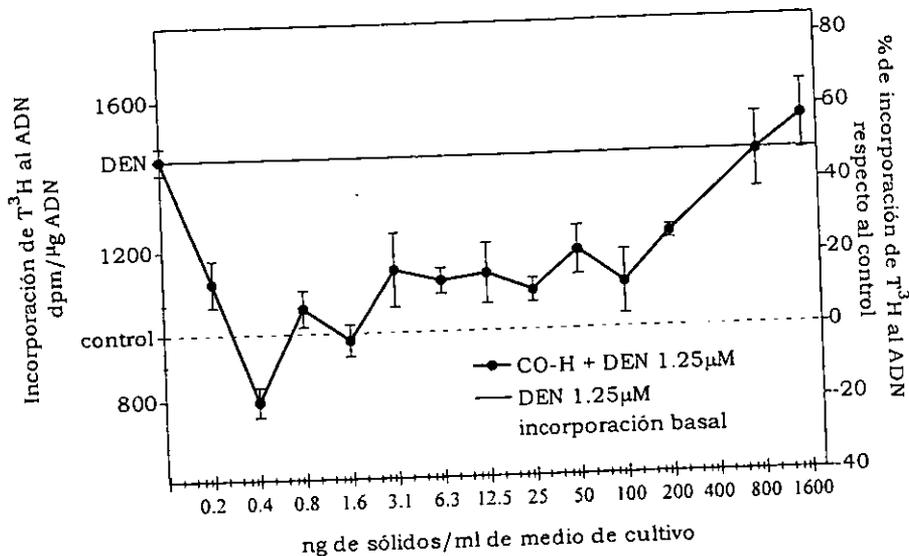
Gráfica 2.- Evaluación del efecto genotóxico producido por DEN en CPH. Los hepatocitos fueron tratados durante 4h con DEN (0.625, 1.25, 2.5, 5 y 10 μM) en medio de cultivo con T^3H (4.3 $\mu Ci/ml$). El control no contenía DEN. El CPH se realizó utilizando una rata. Cada tratamiento fue realizado por triplicado.

Protección por el extracto CO-A del daño al ADN que produce DEN en CPH



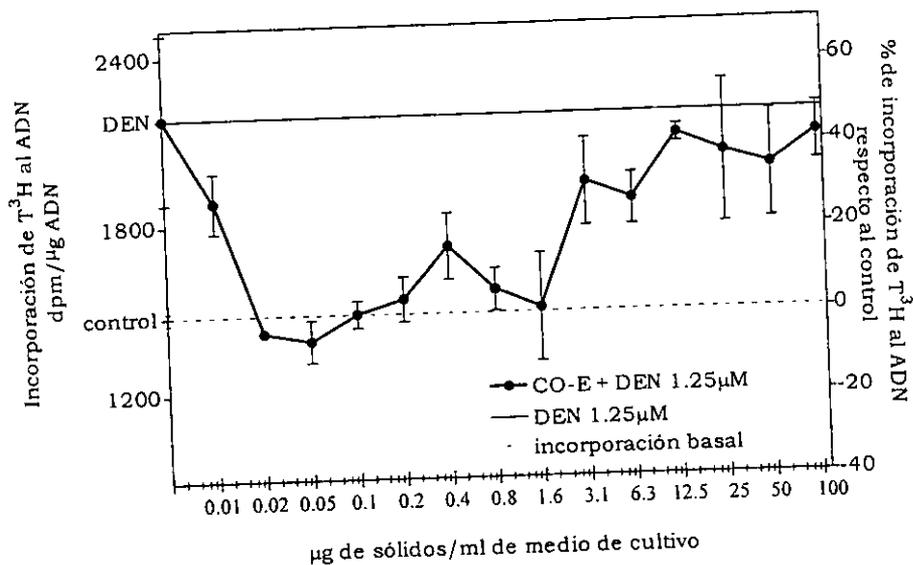
Gráfica 3.- Protección por el extracto CO-A del daño al ADN que produce DEN en CPH. Los hepatocitos fueron tratados durante 4h con el extracto CO-A, se realizaron diluciones seriadas 1:2, iniciando en 50µg hasta 0.01 µg de sólidos del extracto por ml de medio de cultivo con T^3H (4.3µCi/ml) y DEN 1.25µM. El tratamiento DEN (1.25µM) no contenía extracto. El control no contenía DEN ni extracto. El CPH se realizó utilizando una rata. Cada tratamiento fue realizado por triplicado.

Protección por el extracto CO-H del daño al ADN que produce DEN en CPH



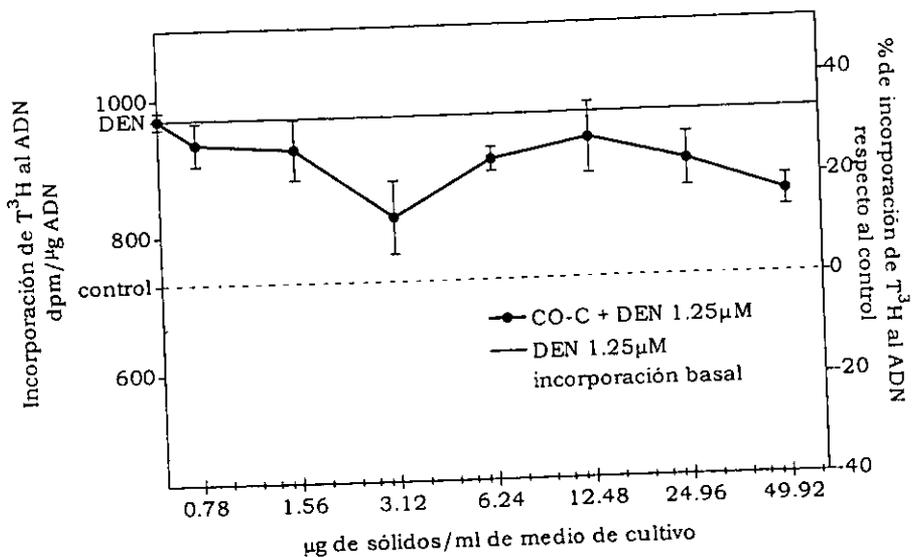
Gráfica 4.- Protección por el extracto CO-H del daño al ADN que produce DEN en CPH. Los hepatocitos fueron tratados durante 4h con el extracto CO-H, se realizaron diluciones seriadas 1:2, iniciando en 1600 ng hasta 0.21 ng de sólidos del extracto por ml de medio de cultivo con T³H (4.3µCi/ml) y DEN 1.25µM. El tratamiento DEN (1.25µM) no contenía extracto. El control no contenía DEN ni extracto. El CPH se realizó utilizando una rata. Cada tratamiento fue realizado por triplicado.

Protección por el extracto CO-E del daño al ADN que produce DEN en CPH



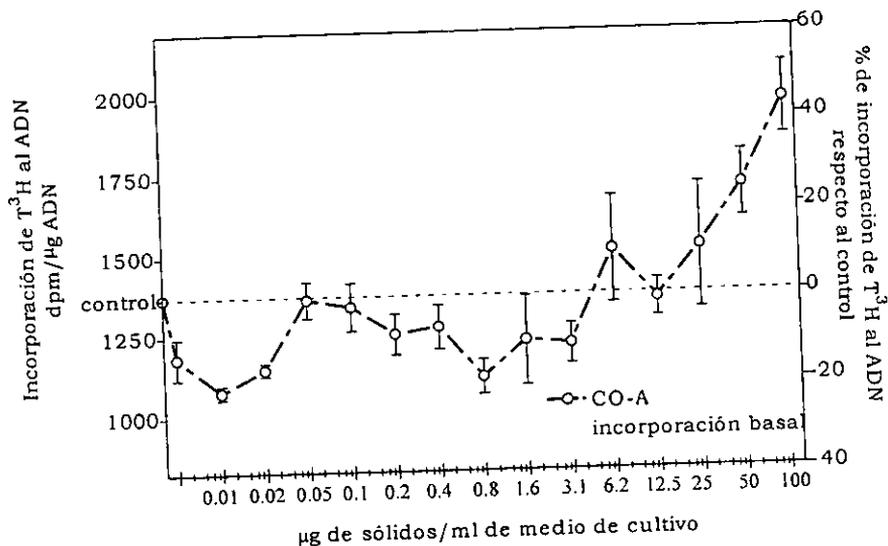
Gráfica 5.- Protección por el extracto CO-E del daño al ADN que produce DEN en CPH. Los hepatocitos fueron tratados durante 4h con el extracto CO-E, se realizaron diluciones seriadas 1:2, iniciando en 100 μg hasta 0.01 μg de sólidos del extracto por ml de medio de cultivo con T^3H (4.3 μCi /ml) y DEN 1.25 μM . El tratamiento DEN (1.25 μM) no contenía extracto. El control no contenía DEN ni extracto. El CPH se realizó utilizando una rata. Cada tratamiento fue realizado por triplicado.

Protección por el extracto CO-C del daño al ADN que produce DEN en CPH



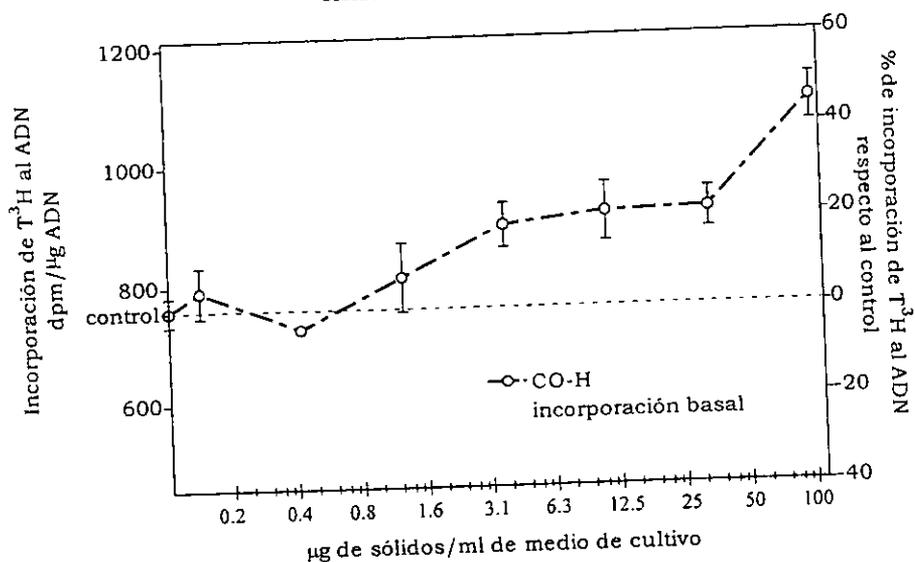
Gráfica 6.- Protección por el extracto CO-C del daño al ADN que produce DEN en CPH. Los hepatocitos fueron tratados durante 4h con el extracto CO-C, se realizaron diluciones seriadas 1:2, iniciando en 50 μg hasta 0.78 μg de sólidos del extracto por ml de medio de cultivo con T^3H (4.3 $\mu Ci/ml$) y DEN 1.25 μM . El tratamiento DEN (1.25 μM) no contenía extracto. El control no contenía DEN ni extracto. El CPH se realizó utilizando una rata. Cada tratamiento fue realizado por triplicado.

Evaluación del daño al ADN producido por el extracto CO-A en CPH



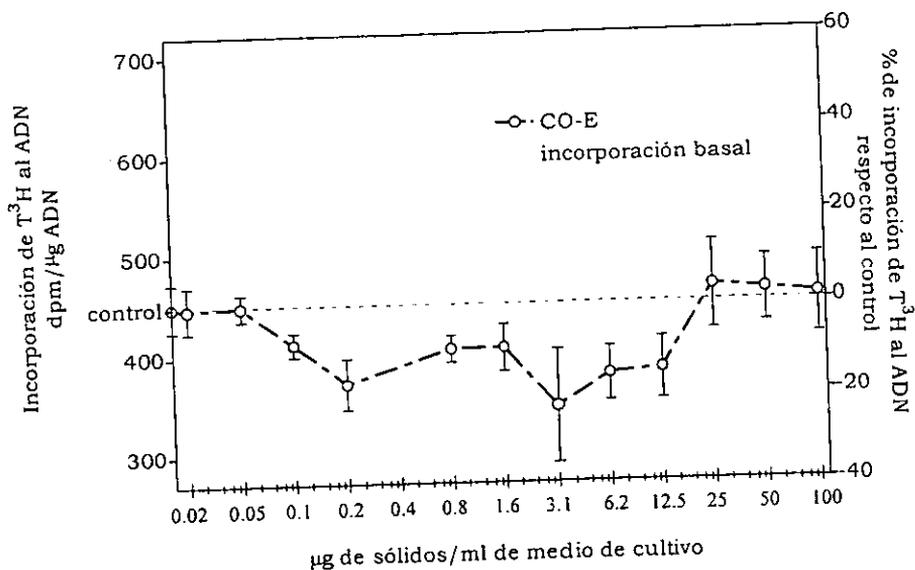
Gráfica 7.- Evaluación del efecto genotóxico producido por el extracto CO-A en CPH. Los hepatocitos fueron tratados durante 4h con el extracto CO-A, se realizaron diluciones seriadas 1:2, iniciando en 100µg hasta 0.006 µg de sólidos del extracto por ml de medio de cultivo con T³H (4.3µCi/ml). El control no contenía extracto. El CPH se realizó utilizando una rata. Cada tratamiento fue realizado por triplicado.

Evaluación del daño al ADN producido por el extracto CO-H en CPH



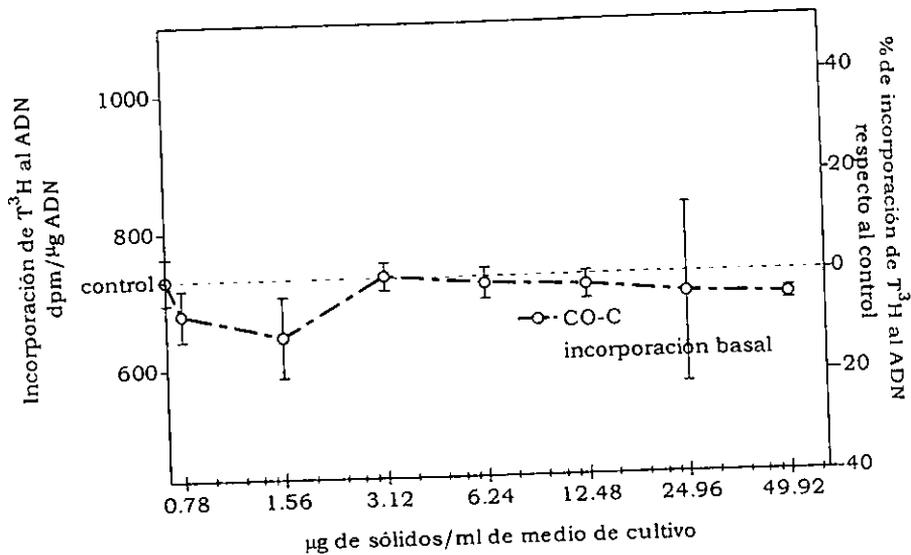
Gráfica 8.- Evaluación del efecto genotóxico producido por el extracto CO-H en CPH. Los hepatocitos fueron tratados durante 4h con el extracto CO-H, se realizaron diluciones seriadas 1:3, iniciando en 100µg hasta 0.14 µg de sólidos del extracto por ml de medio de cultivo con T³H (4.3µCi/ml). El control no contenía extracto. El CPH se realizó utilizando una rata. Cada tratamiento fue realizado por triplicado.

Evaluación del daño al ADN producido por el extracto CO-E en CPH



Gráfica 9.- Evaluación del efecto genotóxico producido por el extracto CO-E en CPH. Los hepatocitos fueron tratados durante 4h con el extracto CO-E, se realizaron diluciones seriadas 1:2, iniciando en 100µg hasta 0.024 µg de sólidos del extracto por ml de medio de cultivo con T³H (4.3µCi/ml). El control no contenía extracto. El CPH se realizó utilizando una rata. Cada tratamiento fue realizado por triplicado.

Evaluación del daño al ADN producido por el extracto CO-C en CPH



Gráfica 10.- Evaluación del efecto genotóxico producido por el extracto CO-C en CPH. Los hepatocitos fueron tratados durante 4h con el extracto CO-C, se realizaron diluciones seriadas 1:2, iniciando en 50 μg hasta 0.78 μg de sólidos del extracto por ml de medio de cultivo con T^3H (4.3 $\mu Ci/ml$). El control no contenía extracto. El CPH se realizó utilizando una rata. Cada tratamiento fue realizado por triplicado.

7. DISCUSIÓN.

En diversos estudios *in-vitro* se ha señalado el potencial genotóxico de DEN en cultivos de linfocitos, en líneas celulares, etc. además de su capacidad mutagénica en *Salmonella typhimurium* (Ensayo de Ames), *Saccharomyces cerevisiae* y *Drosophila melanogaster* (Verna y cols., 1996). En estos casos, los experimentos dependieron de la activación con microsomas hepáticos. La evaluación realizada por nosotros en CPH de la genotoxicidad de DEN, concuerda con estudios anteriores. La concentración 1.25 μ M de DEN que se utilizó en los experimentos de protección con los extractos, probablemente fue la que causó mayor daño al ADN, por que permitió a los hepatocitos o a las enzimas del citocromo P450 mayor eficiencia en la producción de electrófilos (figura 4) que se unen al ADN.

Los extractos CO-A y CO-H, muestran similitud en su propiedad genotóxica en CPH (Gráfica 7 y 8), ya que a una concentración de 100 μ g de sólidos por ml de medio, respectivamente produjeron una incorporación de T³H al ADN de 40% y 43% mayor que el control, que equivale al daño que produce el carcinógeno DEN a 1.25 μ M. La concentración de 100 μ g/ml puede considerarse alta si examinamos que se expuso a aproximadamente 6.0X10⁵ hepatocitos, y si extrapolamos en un humano de 70Kg asumiendo absorción total y omitiendo dilución en otros tejidos, se tendría que exponer al hígado de ese individuo a 23 gramos del extracto en un periodo de 4 h, y tomando en cuenta la concentración promedio de los dos

extractos (5mg de sólidos/ml) equivaldría a ingerir 4.5 litros de extracto para producir daño genotóxico similar al de DEN. Por otra parte, ambos extractos mostraron protección absoluta contra el daño que produce DEN cuando se expusieron simultáneamente en el CPH, sin embargo, existió diferencia en la efectividad, ya que el extracto CO-H tuvo mayor efecto desde 0.4ng/ml hasta 200ng/ml, mientras que CO-A fue desde 20ng/ml hasta 800 ng/ml. En los cuatro extractos, las concentraciones que protegieron al ADN no fueron genotóxicas en CPH, y para el caso de CO-A Y CO-H se requiere incrementar la concentración máxima que protege, 30 y 6 veces más respectivamente para que empiece a ser genotóxica, lo que podría ser una ventaja relacionada a seguridad en el uso de los extractos.

Los componentes de los extractos realizados no se conocen, sin embargo, los extractos CO-A y CO-H, son similares, y ambos tienen componentes en común con el extracto CO-E, que a su vez sus componentes coexisten en el extracto CO-C, esta presunción se reafirma si observamos el espectro de absorción de luz UV (Gráfica 1), donde los tres extractos más polares absorben en la región UV de forma similar.

Las propiedades de las infusiones y tinturas de *C. officinalis*, así como el reporte de la existencia de glicosidos 2-O-flavonoles en las flores de *C. officinalis* (Pietta y cols., 1992), nos permite sugerir a los *flavonoides* como los posibles componentes activos de los extractos CO-A y CO-H, esto es congruente con el espectro de absorción UV de los extractos, donde ambos tienen un máximo de absorción en dos bandas, la primera en

335nm y la segunda en 255nm de longitud de onda (Gráfica 1), longitudes de onda donde se han identificado los flavonoles presentan dos bandas, una con mayor amplitud entre 350-385nm y otra más definida entre 250-280nm (Markham, 1982). Los flavonoides están ampliamente distribuidos en vegetales, se estima que ingerimos 1g por día, se les atribuyen propiedades antibacterianas, antivirales, antitumorales, antiinflamatorias, antioxidantes, anticarcinógenas, etc. (Asad y cols., 1998), los mecanismos de acción de los flavonoides no están bien definidos, pero se ha demostrado que concentraciones alrededor de 100 μ M *in vitro*, rompen al ADN del plásmido pBR322 en presencia de Cu²⁺ y generan especies reactivas de oxígeno ROS (Said y cols., 1992), esto puede tener relación con la capacidad genotóxica de los extractos CO-A y CO-H a elevadas concentraciones. Los flavonoides pueden inhibir a los citocromos P450 monooxygenasa, y activar enzimas detoxificantes como la glutatión S-transferasa, epóxido hidrolasa y quinona reductasa, lo que se ha relacionado con la capacidad de inhibir la activación metabólica de carcinógenos químicos como el benzopireno y las aflatoxinas (Asad y cols., 1998). Algunos flavonoides estimulan a la p-glicoproteína (p-gp) que interviene en la eliminación de carcinógenos químicos como el dimetil benzaantraceno (Phang y cols., 1993). Estos podrían ser algunos mecanismos que expliquen la capacidad protectora de los extractos CO-A y CO-H contra el carcinógeno DEN, sin embargo, otro posible mecanismo, es el de la captura del electrófilo producido en el metabolismo de DEN por la

enzima CYP2E1, ya que los flavonoides al igual que otros polifenoles y el ADN son nucleófilos, blanco de los iones electrófilos.

El efecto protector de los extractos puede ser debido al sinergismo entre los componentes de la planta, es decir, diversas saponinas, flavonoides, triterpenoides, pueden actuar en conjunto para evitar el daño al ADN por el carcinógeno DEN.

El extracto CO-E, al igual que los dos extractos más polares, también mostró resultados interesantes, ya que protegió totalmente al ADN a concentraciones desde 0.02µg/ml hasta 1.6µg/ml del daño que produce DEN (Gráfica 5), además el extracto no fue genotóxico incluyendo 100µg/ml (Gráfica 9), consideramos que probablemente sus propiedades se deben también a flavonoides, sin embargo, al igual que el extracto CO-C, puede contener sustancias lipofílicas como saponinas, alcoholes triterpénicos, con actividad antiinflamatoria, y que pueden tener propiedad anticarcinógena. Diversos alcoholes triterpénicos presentes en las flores de *C. officinalis* como el ψ -Taraxasterol, β -Amirina, lupeol, etc., han mostrado capacidad de inhibir la acción inflamatoria del aceite de Crotón (Zitterl-Eglseer y cols., 1997) (Della Loggia 1994) y del 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA), también conocido por su acción en la etapa de promoción en carcinogénesis (Akihisa y cols., 1996).

El efecto en los CPH de los residuos de etanol de los extractos CO-H y CO-E, y el cloroformo del extracto CO-C, no se determinó, y es posible que se lleve a cabo alguna interacción ya sea con los componentes de los

extractos, o con el metabolismo de DEN. El mecanismo de acción del etanol en combinación con carcinógenos no es claro, ya que en experimentos *in-vivo*, (Swann, 1984), se señala que el etanol inhibe el metabolismo de DEN en el hígado, y el DEN no metabolizado puede ser bioactivado por otros tejidos, incrementando la formación de aductos en ellos. Ingelman-Sundeberg (1988), señala que el etanol induce expresión de enzimas como la CYP2E1, en la región centrilobular más que en la periportal en el hígado. La inducción de CYP2E1 por etanol y acetona también fue señalada por Yang (1990), y propone que el mecanismo está relacionado con el incremento en los niveles del mRNA y su estabilización.

8. CONCLUSIONES.

Los extractos de las flores ligulares de *C. officinalis* L. contienen componentes aún no definidos capaces de proteger contra el daño que produce DEN al ADN en cultivos primarios de hepatocitos. Consideramos que los mismos componentes que protegen al ADN pueden tener efectos genotóxicos cuando se administran a grandes concentraciones. Estos resultados son alentadores y justifican mayor investigación hacia las propiedades de las flores, y sobre todo estudios donde se utilicen extractos o componentes aislados, en modelos de carcinogénesis *in-vivo*, ya que las propiedades antígenotóxicas probadas pueden tener considerable repercusión en las etapas de iniciación y promoción en carcinogénesis por sustancias químicas.

9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

- Akagi K., Hirose M., Hoshiya T., Mizoguchi Y., Ito N., Shirai T. (1995). **Modulating effects of ellagic acid, vanillin and quercetin in a rat medium term multi-organ carcinogenesis model.** Cancer Letters. 94. 113-121.
- Akihisa T., Yasukawa K., Oinuma H., Kasahara Y., Yamanouchi S., Takido M., Kumaki K. And Tamura T. (1996). **Triterpene alcohols from the flowers of compositae and their anti-inflammatory effects.** Phytochemistry. 43 (6). 1255-1260.
- Asad, D.F., Singh, S., Ahmad, A. And Hadi, S.M. (1998). **Flavonoids: antioxidant in diet and potential anticancer agent.** Medical Science Research. 26. 723-728.
- Barcelo S., Gardiner J., Gesher A. and Chipman J. (1996). **CYP2E1-mediated mechanism of antigenotoxicity of the broccoli constituent sulforaphane.** Carcinogenesis. 17.(2). 277-282.
- Berry M. and Friend D. (1969). **High yield preparation of isolated rat liver parenchymal cells. A biochemical and fine structure study.** J. Cell. Biol. 43. 506-520.
- Boucaud-Maitre Y., Algernon O., Raynaud J. (1988). **Cytotoxic and antitumoral activity of *Calendula officinalis* extracts.** Pharmazie 43(3) 220-1.
- Buiatti E. (1997). **The role of chemoprevention in cancer control.** Salud Pública de México. 39 (4), 310-317.
- Della Loggia R., Tubaro A., Sosa S., Becker H., Saar S., Isaac O. (1994) **The role of triterpenoids in the topical anti-inflammatory activity of *Calendula officinalis* flowers.** Planta Med. Dec. 60 (6) 516-20
- Dirección General de Estadística e Informática de la Secretaría de Salud, México. (1997). **Estadísticas sobre tumores malignos en México.** Salud Pública de México. 39 (4), 388-399.
- Dumenil. G., Chemli, R., Balansard, G. (1980). **Evaluation of antibacterial properties of *Calendula officinalis* flowers and mother homeopathic tinctures of *Calendula officinalis*.** Anales Pharmaceutiques Francaises. 38. 493-499.
- Elias R., De Méo M., Vidal-Ollivier E., Laget M., Balansard G., Dumenil G. (1990). **Antimutagenic activity of some saponins isolated from *Calendula officinalis* L., *C. arvensis* L. and *Hedera helix* L.** Mutagenesis 5(4) 327-31.
- Helzlsouer K., Block G., Blumberg J., Diplock A., Levine M., Marnett L., Schulplein R., Spence J. and Simic M. (1994). **Summary of the Round Table Discussion on Strategies for Cancer Prevention: Diet, Food, Additives, Supplements, and Drugs.** Cancer Research (Suppl.) 54, 2044s-2051s

- Hirose M., Yada H., Hakoi K., Takahashi S. and Ito N. (1993). **Modification of carcinogenesis by α -tocopherol, t-butylhydroquinone, propylgallate and butylated hydroxytoluene in a rat multi-organ carcinogenesis model.** Carcinogenesis. 14 (11). 2359-2364.
- Huang C. (1987). **Retinol (Vitamin A) inhibition of dimethylnitrosamine (DMN) and diethylnitrosamine (DEN) induced sister-chromatid exchanges in V79 cells and mutation in Salmonella/microsome assays.** Mutation Research. 187. 133-140.
- Ingelman-Sunberg, M., Johansson, I., Penttilä, K.E., Glaumann, H. and Lindros, K.O. (1988). **Centrilobular expression of ethanol-inducible cytochrome P-450 (IIE1) in rat liver.** Biochem. Biophys. Res. Commun. 157: 55-60.
- IARC. International Agency for Research on Cancer. (1978). **IARC Monographs on the Evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans: Some N-Nitroso Compounds.** World Health Organization, 17, 83-124.
- IARC. International Agency for Research on Cancer. (1992). **Mechanisms of carcinogenesis in risk identification.** World Health Organization, 116.
- Klouček-Popova E, Popov A, Pavlova N, Krusteva S. (1982). **Influence of the physiological regeneration and epithelialization using fractions isolated from *Calendula officinalis*.** Acta Physiologica Pharmacologica Bulgarica 8 (4) 63-7
- Lewin B. (1997). GENES VI. Oxford University Press. pp.519
- Leyva, A. and Kelley, W. (1974). **Measurement of DNA in cultured human cells.** Analytical biochemistry, 62, 173-179
- Loveless A. (1979). **Possible relevance of O-6-alkylation of deoxyguanosine to the mutagenicity and carcinogenicity of nitrosamines and nitrosamides.** Nature. 223, 206-207.
- Man J., Araki S., Joong D., Beom C., Takasuka N., Baba-Toriyama H., Ota T., Nir Z., Khachik F., Shimidzu N., Tanaka Y., Osawa T., Uraji T., Murakoshi M., Nishino H. and Tsuda H. (1998). **Chemopreventive effects of carotenoids and curcumins on mouse colon carcinogenesis after 1,2-dimethylhydrazine initiation.** Carcinogenesis. 19 (1). 81-85
- Markham, K. (1982). **Techniques of Flavonoid Identification.** Academic Press, London-New York-Paris, . Capitulo 3.
- Mathews-Roth M. (1982). **Antitumor Activity of β -carotene, canthaxanthin and phytoene.** Oncology. 39. 33-37.
- Miller DM, Blume S, Borst M. (1990). **Oncogenes, malignant transformation, and modern medicine.** Am J. Med Sci. 300, 59-69.
- Mitchell A., Casciano D., Meltz M., Robinson D., San R., Williams G. and Von-Halle E. (1983). **Unscheduled DNA synthesis test: a report of the U.S. environmental protection agency Gene-Tox Program.** Mutation Research. 123, 363-410.

- Mohar A., Frias-Mendivil M., Suchil-Bernal L., Mora-Macias T., De la Garza J. (1997). **Epidemiología descriptiva de cáncer en el Instituto Nacional de Cancerología de México**. Salud Pública de México. 39, 253-258.
- Murphy G., Lawrence W. and Lenhard R. 1996. **Oncología Clínica, manual de la American Cancer Society**. Segunda Edición. Pp. 187-201.
- Phang J., Poore C., Lopaczynaska J. and Yeh G. (1993). **Flavonol stimulated efflux of 7,12 di methyl benz[a]anthracene in multidrug resistant breast cancer cells**. Cancer Res. 53. 5977-5981.
- Pietta P., Bruno A., Mauri P., Rava A. (1992). **Separation of flavonol-2-O-glycosides from *Calendula officinalis* and *Sambucus nigra* by high-performance liquid and micellar electrokinetic capillary chromatography**. J. Chromatography. 593 (1-2). 165-70
- Prashar R., Kumar A., Hewer A., Cole K., Davis W., Phillips D. (1998). **Inhibition by an extract of *Ocimum sanctum* of DNA-binding activity of 7,12-dimethylbenz[a]anthracene in rat hepatocytes in vitro**. Cancer Letters 128 (2). 155-160.
- Ramos A., Edreira A., Vizoso A., Betancourt J., López M., Decalo M. (1998). **Genotoxicity of an extract of *Calendula officinalis* L.** Journal of Ethnopharmacology 61, 49-55.
- Said M., Fabeha A., Arshad Rahman, Hadi S. And Parish J. (1992). **Activities of flavonoids for the cleavage of DNA in the presence of Cu(II): correlation with generation of active oxygen species**. Carcinogenesis. 13(4); 605-608.
- Seglen, P.O. (1976). **Preparation of isolated rat liver cells**. Methods in cell biology. 13, 29-83.
- Sit, K. H., Wong, K. P., Bay B. H. (1991). **An efficient and simple method of non-enzymatic detachment of monolayer cultures into single cell suspension**. J. Tiss. Cult. Meth. 13: 257-259.
- Swann, P.F. (1984). **Effect of ethanol on nitrosamine metabolism and distribution. Implications for the role of nitrosamines in human cancer and for the influence of alcohol consumption on cancer incidence**. IARC 57: 501-512.
- Swierenga, S., Bradlaw, J.A., Brillinger, R.L., Gilman J.P., Nestmann, E.R. y San, R.C. (1991). **Recommended protocols based on a survey of current practice in genotoxicity testing laboratories: Uncheduled DNA synthesis assay in rat hepatocyte cultures**. Mutation Research. 246, 235-253.
- Torroella-Kouri, M. Villa-Treviño, S. (1998). **Bases genéticas del cáncer**. Fondo de cultura económica, México, D.F. (1998).
- Tseng T., Kao E., Chu C., Chou F., Lind H. and Wang C. (1997). **Protective effects of dried flower extracts of *Hibiscus sabdariffa* L. against oxidative stress in rat primary hepatocytes**. Food and Chemical Toxicology. 35. 1159-1164.

- Verna L., Whysner J. and Williams G. (1996). **N-Nitrosodiethylamine Mechanistic Data and Risk Assessment: Bioactivation, DNA-Adduct Formation, Mutagenicity, and Tumor Initiation.** Pharmacology Therapy. 71 (1-2), 57-81.
- Wingo P., Ries L., Rosenberg H., Miller D. and Edwards B. (1998). **Cancer Incidence and Mortality, 1973-1995: A Report Card for the U.S.** Cancer. 82 (6), 1197-1207.
- Yang C., Yoo J., Ishizaki H. and Hong J. (1990). **Cytochrome P450IIE1 in the dealkylation and denitrosation of N-nitrosodimethylamine in rat liver microsomes.** Carcinogenesis. 11. 2239-2243.
- Zitterl-Eglseer K, Sosa S, Jurenitsch J, Schubert-Zsilavec M, Della Loggia R, Tubaro A, Bertoldi M, Franz C. (1997). **Anti-oedematous activities of the main triterpenoid esters of marigold (*Calendula officinalis* L.).** Journal of Ethnopharmacology. 57(2) 139-44