



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
CUAUTITLÁN

**“EFECTO ANTIGENOTÓXICO DEL JUGO DE TORONJA CONTRA  
EL DAÑO PRODUCIDO POR LA DAUNORRUBICINA *IN VIVO*”**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

P R E S E N T A :

**RAÚL MOJICA ESPINOSA**

ASESORES: M. en C. ROSA ISELA ÁLVAREZ GONZÁLEZ

Dr. EDUARDO MADRIGAL BUJAI DAR

Cuautitlán Izcalli, Estado de México, Octubre 2001 *lf*



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.



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

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

U. N. A. M.  
FACULTAD DE ESTUDIOS  
SUPERIORES CUAUTITLAN



Departamento de  
Exámenes Profesionales

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

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:

"Efecto antigenotóxico del jugo de toronja contra el daño producido por la daunorrubicina in vivo".

que presenta el pasante: Raúl Mojica Espinosa  
con número de cuenta: 9227290-5 para obtener el título de:  
Químico Farmacéutico Biólogo

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

**A T E N T A M E N T E**

**"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"**

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 29 de Octubre de 2003

PRESIDENTE	<u>QFB. Ma. Esther Revuelta Miranda</u>	
VOCAL	<u>MC. Sandra Díaz Barriga Arceo</u>	
SECRETARIO	<u>MC. Rosa Isela Alvarez González</u>	
PRIMER SUPLENTE	<u>QFB. Rosalba Bonilla Sánchez</u>	
SEGUNDO SUPLENTE	<u>QFI. Guadalupe Koizumi Castro</u>	

El presente trabajo fue realizado en el laboratorio de Genética de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán de la Universidad Nacional Autónoma de México y en el laboratorio de Genética de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional.

## AGRADECIMIENTOS

A Dios por permitirme estar aquí...

A mis padres Yolanda Espinosa Galván y Raúl Mojica Vargas: por concebirme, educarme, darme mucho más de lo necesario, en especial mucho amor, el cual es correspondido...

A mis hermanas Yolanda Elvira y Yubiamaría por su amor y apoyo...

A cada miembro de mi familia por estar conmigo en todo momento...

A todos mis amigos en especial a: Iván, David, Lorena, Karina, Oscar, Edgar, Fabiola, Nadia por su cariño y apoyo incondicional...

A la educación pública, en especial a la Universidad Nacional Autónoma de México y a mis maestros que me dieron su dedicación y comprensión ...

A mis asesores, Isela Álvarez González y el Dr. Eduardo Madrigal Bujaidar por transmitirme su conocimiento, por su paciencia, cariño y comprensión ...

A mis compañeros y amigos del laboratorio de Genética de la ENCB ...

Sinceramente ;¡ GRACIAS !!

## **DEDICATORIA**

A mis padres y a mis hermanas:

Mi padre, Raúl Mojica Vargas

Mi madre, Yolanda Espinosa de Mojica

Mis hermanas, Yolanda Elvira Mojica Espinosa y Yubiamaria Mojica Espinosa

A los que no están presentes físicamente y que llevo en mi corazón:

Mi abuelo, Crispín Espinosa Ponce

Mi primo, Abel Salazar Cortes

Mi abuelita, Ma. Magdalena Galván Argüelles

# CONTENIDO

ÍNDICE DE FIGURAS.....	xviii
ÍNDICE DE TABLAS.....	xix
ÍNDICE DE ABREVIATURAS.....	xxi
<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
GENOTOXICIDAD.....	3
CARCINOGENESIS.....	4
MUTAGÉNESIS.....	5
Clasificación de las mutaciones.....	5
Clasificación de los mutágenos.....	7
ANTIMUTAGÉNESIS.....	8
Clasificación de los antimutágenos.....	9
RADICALES LIBRES.....	12
Definición.....	12
Radicales libres en los sistemas biológicos.....	12
ANTIOXIDANTES.....	14
Definición y clasificación.....	14
TORONJA.....	15
Origen.....	15
Taxonomía y morfología.....	15
Requerimientos edafoclimáticos.....	16
Actividad biológica.....	17
Actividad antigenotóxica.....	17
Actividad antioxidante.....	18
Actividad sobre enzimas independientes del citocromo P450.....	18
Actividad antimicrobiana.....	18
Actividad insecticida.....	19
Actividad farmacológica.....	19
DAUNORRUBICINA.....	20
Características generales.....	20
Mecanismos de acción.....	21
Farmacocinética.....	25
INTERCAMBIOS DE CROMÁTIDAS HERMANAS.....	27
Definición.....	27
Antecedentes.....	27
Formación.....	28
Fundamento.....	30
<b>JUSTIFICACIÓN.....</b>	<b>33</b>

<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>34</b>
GENERAL.....	34
PARTICULARES.....	34
<b>METODOLOGÍA.....</b>	<b>35</b>
ELABORACIÓN DE REACTIVOS Y SOLUCIONES.....	35
MÉTODO.....	36
Obtención de metafases.....	38
Tinción diferencial.....	38
Análisis microscópico.....	39
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>40</b>
ENSAYO ANTIGENOTÓXICO.....	40
ENSAYO ANTICITOTÓXICO.....	43
<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>47</b>
ENSAYOS ANTIGENOTÓXICOS Y ANTICITOTÓXICOS.....	48
Efecto genotóxico y citotóxico de la daunorrubicina.....	48
Efecto genotóxico y citotóxico del jugo de toronja.....	50
Efecto antigenotóxico y anticitotóxico del jugo de toronja.....	51
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>55</b>
<b>REFERENCIAS.....</b>	<b>56</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Efectos de los genotóxicos sobre el material genético.....	7
<b>Figura 2.</b> Complejo Fe(III)-daunorrubicina.....	23
<b>Figura 3.</b> Mecanismos de acción de la daunorrubicina, formación de radicales libres y sus implicaciones biológicas.....	24
<b>Figura 4.</b> Formación del radical hidroxilo.....	25
<b>Figura 5.</b> Principales rutas metabólicas de la daunorrubicina en humanos.....	26
<b>Figura 6.</b> Cromosomas teñidos diferencialmente.....	31
<b>Figura 7.</b> Intercambios de cromátidas hermanas.....	32
<b>Figura 8.</b> Efecto del jugo de toronja sobre la frecuencia de intercambios de cromátidas hermanas en células de la médula ósea en ratón.....	42
<b>Figura 9.</b> Efecto del jugo de toronja sobre el índice mitótico.....	49
<b>Figura 10.</b> Efecto del jugo de toronja sobre el tiempo promedio de generación en células de la médula ósea en ratón.....	46

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla I. Administración de los lotes experimentales.....37

Tabla II. Cinética de proliferación celular en células de la médula ósea en  
ratón.....44

## ÍNDICE DE ABREVIATURAS

<b>ADN</b>	ácido desoxirribonucleico
<b>CPC</b>	cinética de proliferación celular
<b>DAU</b>	daunorrubicina
<b>ERO</b>	especies reactivas de oxígeno
<b>ICH</b>	intercambios de cromátidas hermanas
<b>IM</b>	índice mitótico
<b>JT</b>	jugo de toronja
<b>RL</b>	radicales libres
<b>TN</b>	testigo negativo
<b>TP</b>	testigo positivo
<b>TPG</b>	tiempo promedio de generación
<b>5-BrdU</b>	5-bromo-2'-desoxiuridina

# INTRODUCCIÓN

Desde sus inicios, el proceso evolutivo de los seres vivos ha dependido básicamente de la capacidad adaptativa de éstos con su entorno, ya sean los cambios climáticos, la selección natural, las catástrofes naturales, etc. Es por ello que los seres vivos han tenido que modificar o cambiar, tanto sus conductas y necesidades, como a ellos mismos, para lograr sobrevivir y así dejar descendencia. En todos los organismos la manera de registrar y heredar todas esas adaptaciones de una generación a otra, es mediante su material genético (ADN), y si bien es cierto que las conductas sociales o aprendidas no las dicta el material genético, éste si es responsable de crear al organismo con las características similares a las de su especie.

La Genética como ciencia, se inició formalmente con los principios y reglas analíticas propuestas en 1865 por el monje agustino Gregorio Mendel, las cuales no fueron comprendidas por sus contemporáneos sino hasta principios del siglo pasado, cuando Hugo de Vries, Erich Tschermak y Karl Correns redescubrieron dichas investigaciones. Hasta la fecha, la Genética ha avanzado a tal grado que se aplica en múltiples disciplinas, teniendo gran relevancia en campos como la salud o la investigación. A pesar de que hace más de 50 años se conoce la estructura del ADN, y que recientemente se haya completado la secuenciación del genoma humano, aún se considera a la Genética como una ciencia joven, la cual provee una amplia gama de opciones de estudio (1).

La Genética Toxicológica es una de las ramas de la Genética que ha tomado gran auge, en especial desde finales de los 60's, donde se presentaron las primeras investigaciones que relacionaron a los metabolitos carcinogénicos y el ADN (2), es decir, se relacionó a la carcinogénesis con la mutagénesis así como su asociación con la genotoxicidad. Así, se desarrollaron estudios acerca del efecto carcinogénico de ciertos agentes químicos en algunos sistemas celulares. En este contexto, J.H. Weisburger y col. introdujeron el término "genotóxico" para identificar a los carcinógenos que reaccionaban

con el ADN, en contraste con los carcinógenos que ejercían su efecto por otros mecanismos (3).

Se han identificado agentes genotóxicos físicos, químicos y biológicos en prácticamente todas las áreas relacionadas con el hombre: laboral, farmacéutica, alimenticia o de hábitos personales, lo que propició a una especie de saturación genotóxica y, como consecuencia, la búsqueda de estrategias para evitar o reducir los efectos negativos de estos agentes. Dicha información hace posible evitar la exposición a aquellas sustancias mutagénicas por otras "innocuas" cuando esto es factible, o bien, modificar la estructura molecular de los mutágenos con la idea de que este cambio elimine el potencial genotóxico (4, 5). En esta búsqueda de soluciones surgió el conocimiento de que en el universo de agentes químicos también se encuentran los antimutágenos o antígenotóxicos, es decir, aquellos agentes que son capaces de reducir o eliminar el daño al material genético en los organismos, independientemente de que éste sea espontáneo ó inducido (4).

Esta búsqueda es de vital importancia, por un lado, nos ayuda a esclarecer los procesos de homeostasis celular, mutagénesis y carcinogénesis al estudiar los mecanismos de acción de los antígenotóxicos, y por otro, a obtener conocimientos más confiables y completos acerca de los hábitos, comportamientos personales, hábitos, alimentos o compuestos que ayuden por ejemplo, en la lucha contra el cáncer; ya que se ha estimado que un 50% o más de dicha enfermedad se podría prevenir si se llevaran a cabo ciertos hábitos y costumbres, como: el dejar de fumar, llevar una dieta baja en grasas y calorías incrementado el consumo de frutas y verduras (6, 7), así como una rutina de ejercicio y el control del peso (8, 9).

Un aspecto que cabe mencionar, es el hecho de que independientemente de los agentes genotóxicos a los que estamos expuestos por el contexto generado por ambientes laborales, urbanización o estatus socioeconómico de un país, existen genotóxicos a los que hemos estado expuestos desde siempre y que pueden causar mutaciones. Dentro de los más comunes y universales se encuentran los radicales libres (RL), de los cuales hablaremos mas adelante. De tal forma, surgió la necesidad de estudiar antígenotóxicos fáciles de

adquirir - en costos y disponibilidad - y consumir de manera segura, común y habitual, con el fin de protegernos contra aquellos genotóxicos universales, y de manera más específica, como estrategia para prevenir el daño provocado por agentes implícitos en el medio ambiente, por ejemplo: la contaminación, el estrés, el crecimiento desmedido de las ciudades, entre otros, o bien, por cultura y economía, razones por las que no se tiene ni la conciencia ni los recursos para mejorar la alimentación o asistir regularmente a revisiones médicas, con los cuales se podría tener un diagnóstico temprano de alguna enfermedad y así tener una terapia temprana e incrementar la oportunidad de cura (10). Estos, entre otros, son problemas muy comunes en países del tercer mundo, como es el caso de México, en donde se podría obtener un beneficio sobre la población, de los antígenotóxicos presentes en la gran diversidad de productos naturales con que se cuenta y de los que no se ha aprovechado todo su potencial, o más grave aún, no han sido investigados.

Debido a lo anterior, en esta investigación en particular, se intenta aportar datos útiles sobre los efectos antígenotóxicos del jugo de toronja contra los efectos producidos por los RL generados por la daunorrubicina (DAU).

## GENOTOXICIDAD

Se puede definir como un genotóxico a todo aquel agente físico, químico o biológico capaz de ejercer algún efecto nocivo sobre el material genético, alterando sus funciones y generando diferentes trastornos celulares.

Existen varios aspectos que intervienen en el efecto de los agentes genotóxicos, que se pueden dividir en tres puntos generales:

- Del genotóxico: sus características fisicoquímicas, su farmacocinética, farmacodinamia, etc.
- La idiosincrasia de cada individuo: la condición de los mecanismos de defensa y reparación del daño, su salud, predisponibilidad génica, etc.

- La exposición del individuo al genotóxico: Cantidad y tiempo de exposición, alimentación, costumbres, hábitat, ocupación, etc.

La ciencia encargada de estudiar a los genotóxicos, su identificación, sus efectos, consecuencias y prevención es la Genética toxicológica la cual se reconoció como ciencia en 1969 cuando Hollaender y otros genetistas fundaron la "Environmental Mutagen Society" preocupados por la salud pública afectada por los fenómenos que incidían sobre el material genético, tales como las enfermedades crónicas degenerativas en donde el más clásico ejemplo es el cáncer.

## CARCINOGENESIS

La carcinogénesis es el proceso mediante el cual se produce y desarrolla el cáncer, por ende un carcinógeno, por definición, es un agente que causa o induce cáncer, aunque este concepto está a discusión debido a que la carcinogénesis no es producida en su totalidad a un solo evento o agente, sino que es inducida y desarrollada por múltiples factores de muy diversos orígenes y mecanismos.

El término genotóxico surgió precisamente por la necesidad de distinguir a aquellos carcinógenos que interactuaban con el ADN de los que no lo hacían, es decir que no en todos los tipos de cáncer tienen como inicio a las mutaciones (2).

- Carcinógenos genotóxicos: contribuyen en el proceso canceroso directamente o a través de especies o metabolitos reactivos, dañando al ADN.
- Carcinógenos no genotóxicos o epigenéticos: son sustancias químicas o virales, que ejercen su efecto por mecanismos que no comprenden daño al ADN. El origen de estos carcinógenos pueden ser exógenos o endógenos: en el primer caso se pueden incluir a algunos xenobióticos, mientras que en el segundo se encuentran sustancias como las hormonas que ejercen su acción sobre células específicas.

## MUTAGÉNESIS

La mutagénesis es el proceso mediante el cual se origina una mutación, la mutación se define como los cambios al azar en la cantidad, cualidad y arreglo de los genes que se mantiene en las replicaciones celulares subsecuentes, y que tiene la posibilidad de manifestarse como una alteración cromosómica y/o como un cambio fenotípico en los organismos afectados (11), es decir, es un error en el almacenaje de la información genética. En éste concepto el carácter de aleatorio está en entredicho ya que el material genético no es una molécula que se encuentre aislada con el exterior sino por el contrario, existen diversos agentes externos que interactúan con el ADN y lo afectan causándole mutaciones, dichos agentes son conocidos como mutágenos. Se han realizado algunos experimentos en donde se sugiere que existe una maquinaria genética responsable de responder al ambiente produciendo mutaciones adaptativas, o sea, que la célula al estar en un estrés mutacional, activa a los genes inductores cierta maquinaria; lo cual tiene como consecuencia que la célula permanezca en un estado hipermutable, con el fin de sobreponerse a ese estrés y así sobrevivir; esta hipótesis es lógica, ya que las mutaciones son una explicación del proceso evolutivo, sólo que ha sido difícil demostrarlo en modelos a corto tiempo.

### Clasificación de las mutaciones

Hay diferentes criterios para clasificar a las mutaciones una es por su origen que serían las espontáneas o naturales (aleatorias) como las causadas por los cambios tautoméricos, y las inducidas (no aleatorias) causadas por los mutágenos. Otra es si son mutaciones somáticas o germinales, en el primer caso la mutación ocurre en células somáticas pudiendo, no manifestarse en organismos diferenciados, por el contrario, si la mutación se presenta en estados germinales poco o no diferenciados puede causar teratogénesis. En el segundo caso si la mutación se produce en las células germinales esta puede transmitirse a la descendencia o bien causando problemas de fertilidad o esterilidad (figura 1). Por su morfología pueden ser:

❖ Génicas o puntuales

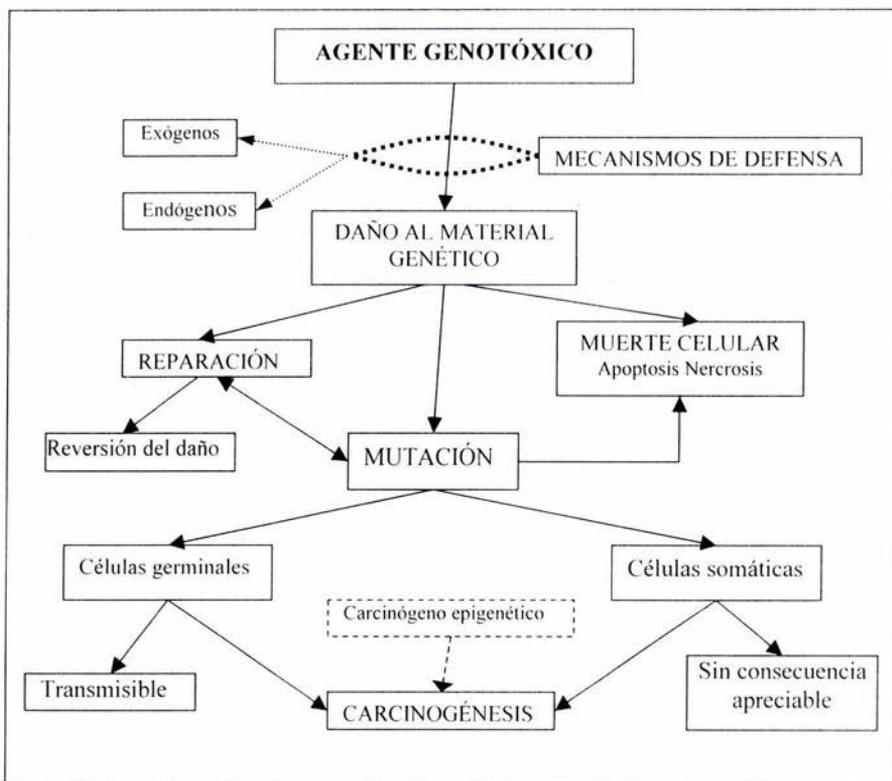
- ◆ Transiciones: cambio de purina por purina o pirimidina por pirimidina.
- ◆ Transversiones: cambio de purina por pirimidina o viceversa.
- ◆ Eliminaciones: deleción de uno o más nucleótidos (Cambio de fase).
- ◆ Inserciones: inserción de uno o más nucleótidos (Cambio de fase).
- ◆ Sin sentido: crea un codón de terminación.

❖ De extensión variable

- ◆ Cambios en la estructura de los cromosomas
  - Deleciones: pérdida intracromosómica de material.
  - Translocaciones: intercambio intercromosómico de material.
  - Inversiones: corte y giro de 180° de material intracromosómico.
  - Inserciones: traspaso de material de un cromosoma a otro.
  - Duplicaciones: Repetición de un fragmento cromosómico.
  - Expansión de tripletes repetidos.
- ◆ Cambio en el número de cromosomas
  - Aneuploidías: Poseen un número incompleto de cromosomas.
  - Poliploidías: Número distinto de cromosomas.

O bien desde el punto de vista funcional, las cuales pueden ser:

- Silenciosas: no se observa ningún efecto en el fenotipo y no parecen ser influidas por la selección natural.
- De cambio de encuadre: (por deleción o inserción) se produce un cambio en la lectura de los tripletes.
- Sin sentido: cambio de una base que convierte un triplete codificante en uno sin sentido a la traducción.
- De elementos de control: al alterar promotores, intensificadores u otras secuencias reguladoras.



**Figura 1.** Efectos de los genotóxicos sobre el material genético.

### Clasificación de los mutágenos

Los mutágenos, también son llamados comúnmente genotóxicos, aunque este término abarca de una manera más amplia a los compuestos que dañan al ADN, ya que no todos producen mutaciones, y se clasifican de acuerdo a su naturaleza como sigue:

- ❖ Físicos
  - ◆ Radiaciones electromagnéticas: rayos cósmicos, catódicos, gamma, UV, etc.
  - ◆ Energía calórica.
- ❖ Químicos

- ◆ Agentes alquilantes: etil y metil metano sulfonato, gases mostaza, etc.
  - ◆ Agentes desaminantes: ácido nitroso, bisulfito, etc.
  - ◆ Análogos de base: 5-bromo-2'-desoxiuridina (5-BrdU), 2- amino purina, etc.
  - ◆ Agentes intercalantes: proflavina, naranja de acridina, etc.
  - ◆ Agentes misceláneos: hidracina, nitroquinolina, hidroxilamina, etc.
- ❖ Biológicos
- ◆ ADN polimerasas alteradas.
  - ◆ Virus.
  - ◆ Trasposones.

## ANTIMUTAGÉNESIS

La búsqueda de agentes con capacidad antimutagénica permitió el surgimiento de lo que conocemos actualmente como *antimutagénesis*, que es el evento de contrarrestar o eliminar los daños mutagénicos provocados por componentes de origen diverso, y que son un factor de riesgo para el material genético, que puede traducirse en cáncer. Es indispensable tomar conciencia de todo lo anterior, para así, desarrollar las medidas adecuadas que detecten y prevengan la exposición a mutágenos en forma oportuna. Sin embargo, se deben tener ciertas precauciones cuando se extrapolan al hombre los resultados obtenidos en la experimentación con animales. Hay que tomar en cuenta que cada sujeto responde de manera particular a la acción de estos agentes mutagénicos, debido a que los aspectos farmacocinéticos están genéticamente determinados y a que hay funciones asociadas a la sensibilidad a carcinógenos, promotores, regulación del metabolismo y a la detoxificación (2).

En el estudio de los antimutágenos se han encontrado algunos problemas, uno de ellos es establecer las dosis para que ejerzan su efecto protector, debido a que la mayoría trabajan a través de múltiples mecanismos, que pueden incluir tanto efectos protectores como efectos adversos y esto debe ser tomado en cuenta en los análisis de riesgo-beneficio(12, 13). Otra limitante que se ha observado en los antimutágenos es su especificidad hacia los diversos tipos de agentes genotóxicos. Así, la importancia de

conocer su mecanismo de acción permite sugerir el tipo de mutágenos contra los cuales pueden prevenir o reducir sus efectos.

## Clasificación de los antimutágenos

Obviamente, los agentes capaces de disminuir la frecuencia de mutaciones se denominan antimutágenos. De Flora (13) propuso una clasificación detallada sobre los puntos de intervención en los cuales es posible prevenir una mutación, además de la secuencia de eventos ocurridos durante el proceso de carcinogénesis, haciendo énfasis en que la clasificación debe ser flexible ya que muchos de los mecanismos se interconectan. Esto incluye una gran variedad de mecanismos tanto celulares como extracelulares que modulan la respuesta genotóxica y la iniciación tumoral, la promoción, progresión, angiogenesis, invasión y metástasis.

### A) Mecanismos Extracelulares

Inhibición del aumento de carcinógenos y mutágenos	Inhibiendo la entrada o penetración Favoreciendo la eliminación del organismo
Inhibición de la formación endógena de mutágenos/carcinógenos	Inhibición de la nitrosación Modificación de la flora intestinal
Formación de complejos, dilución y/o desactivación de mutágenos/carcinógenos	Por medios físicos o mecánicos Por reacciones químicas Por reacciones enzimáticas
Favorecer la absorción de agentes protectores	

B) Inhibición de mutaciones e iniciación del cáncer por mecanismos celulares

Estimulación del bloqueo y detoxificación en células no blanco

Modificación del transporte transmembranal

Modulación del metabolismo

Bloqueo o competencia

Inhibición de la replicación celular

Modulación del metabolismo y reparación del ADN

Control de la expresión génica

C) Inhibición de la promoción tumoral

Inhibición de los efectos genotóxicos

Actividad antioxidante y captura de radicales libres

Inhibición de proteasas

Inhibición de la proliferación celular

Inducción de la diferenciación celular

Inducción de apoptosis

Protección de la comunicación intercelular

Modulación de las señales de transducción

#### D) Inhibición de la progresión tumoral

- Inhibición de los efectos genotóxicos
- Actividad antioxidante y captura de radicales libres
- Inhibición de proteasas
- Modulación de las señales de transducción
- Efectos del estatus hormonal
- Efectos del sistema inmunológico
- Inhibición de la neovascularización
- Actividad antineoplásica de tipo físico, químico o biológico

#### E) Inhibición de la invasión y metástasis

- Inhibición de proteasas (relacionadas en la degradación de las bases membranales y la interacción con la matriz extracelular)
- Inducción de la diferenciación celular
- Inhibición de la neovascularización
- Efecto en las moléculas de adhesión celular
- Actividad antioxidante
- Regulación de las señales de transducción
- Activación de los genes antimetástasis

## RADICALES LIBRES

### Definición

Los radicales libres (RL) son átomos o moléculas que tienen en su último nivel energético un electrón libre, lo que les confiere una alta energía y una configuración espacial que genera gran inestabilidad, por lo tanto, son especies altamente reactivas y de vida media muy corta (14,15).

### Radicales libres en los sistemas biológicos

La generación de RL en los organismos es un proceso natural, dinámico y continuo, inherente para el funcionamiento normal de varios procesos biológicos (16), aunque también se encuentran involucrados en diferentes fisiopatologías.

Algunos ejemplos son: en el metabolismo de cualquier ser vivo, en donde intervengan enzimas de oxidación-reducción, las cuales son las encargadas de catalizar las reacciones redox y por lo tanto hay transferencia de electrones, donde se generan RL, en las mitocondrias, donde se produce aproximadamente el 95% del ATP, por medio de la cadena respiratoria donde el oxígeno actúa como último receptor de electrones. Se ha calculado que de un 2 a un 5% del  $O_2$  consumido en el metabolismo normal se transforma en RL (17), los cuales se consideran dentro de las principales moléculas a las que estamos expuesto y se les han llamado especies reactivas de oxígeno (ERO), tales como el radical hidroxilo ( $\cdot OH$ ), el anión superóxido ( $\cdot O_2^-$ ), el radical peróxido ( $\cdot O_2H$ ), el singulete de oxígeno ( $\cdot O$ ) y el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ). Otro de los procesos metabólicos donde se producen RL, principalmente ERO, es la fagocitosis como mecanismo microbicida, por medio de la NADPH-oxidasa, la superóxido dismutasa, la mieloperoxidasa y la óxido nítrico sintasa. Estos mecanismos pueden ser evadidos por algunos agentes patógenos causando la muerte del fagocito y por lo tanto liberando sus componentes intracelulares, originando con esto la

liberación de RL que ahora actúan en contra del organismo en lugar de contra el agente patógeno.

También existen en el medio ambiente xenobióticos que al estar en contacto con el organismo pueden generar RL, entre los más comunes están: el ozono, los productos de la combustión del tabaco y la polución ambiental, las radiaciones de alta energía o ionizantes como los rayos UV, que al atravesar la piel confiere energía a las biomoléculas propiciando la formación de RL (12,18).

Siendo los RL imprescindibles en los organismos, e ineludible su generación por la influencia del medio ambiente, los seres vivos han desarrollado estrategias para protegerse de los efectos deletéreos de los RL. A la etapa de desequilibrio en el organismo entre los mecanismos antioxidantes y los agentes oxidantes, incluidos los RL, cuando éstos aumentan se le ha denominado estrés oxidativo. Esta situación se puede presentar cuando existe baja concentración o inhabilidad de los mecanismos antioxidantes para controlar la existencia normal de oxidantes, o bien por el aumento excesivo de éstos últimos, por razones fisiopatológicas o por intoxicaciones.

Los daños causados por los agentes oxidantes en el cuerpo son diversos, dentro de ellos, pueden atacar a las biomoléculas, por ejemplo, a los lípidos, produciendo lipoperoxidación, a las proteínas, tanto estructurales como funcionales, generando disminución o anulación de sus funciones, asimismo en los carbohidratos, y no es la excepción el ADN donde los daños generados pueden derivar en mutaciones o muerte celular. Todos estos daños evidentemente tienen repercusiones sobre el organismo y se han asociado a enfermedades crónico degenerativas como el Parkinson, el Alzheimer, la artritis reumatoide o procesos de mutagénesis y carcinogénesis, además la toxicidad de los RL se ha asociado con el envejecimiento.

# ANTIOXIDANTES

## Definición y clasificación

Los antioxidantes que se encuentran naturalmente en el organismo y en ciertos alimentos, bloquean parte de toxicidad producida por los RL oxidantes, entregando electrones que estabilizan y neutralizan los efectos dañinos de los RL, es decir, son sustancias que tienen la capacidad de inhibir la oxidación causada por los agentes oxidantes; actuando algunos a nivel intracelular, otros en la membrana de las células, en la circulación o deteniendo su absorción al organismo; actuando todos con el fin de proteger a los diferentes órganos y sistemas (19).

Los antioxidantes pueden ser endógenos o exógenos, dentro de los endógenos se encuentran diversas enzimas por ejemplo, las enzimas catalasa, glutatión peroxidasa y superóxido dismutasa; en el plasma sanguíneo están la transferrina, lactoferrina, ceruloplasmina y albúmina. Otros antioxidantes encontrados en el plasma sanguíneo o en las células, son sustancias que no son enzimas tales como las bilirrubinas, el ácido úrico, las vitaminas C, E, A, la melatonina, los estrógenos, los flavonoides y algunos metales, como el selenio, cobre, zinc y magnesio, que actúa como cofactores de algunas enzimas antioxidantes(20).

Se debe tener claro que para fines didácticos se estudian todos estos mecanismos y compuestos por separado, pero en realidad en el organismo se presentan de manera simultánea y continua, interactuando entre sí con el fin de contrarrestar los efectos tóxicos de los oxidantes, por ejemplo, el glutatión contiene selenio y ayuda en la prevención de la formación del radical hidroxilo, este mismo regenera la vitamina C, quien a su vez es regenerada por la vitamina E.

Por otro lado los flavonoides, carotenoides y licopenos son compuestos polifenólicos que se encuentran en las algunas plantas y han resultado ser excelentes antioxidantes. Algunos ejemplos donde los podemos encontrar comúnmente es en el té negro, el té verde, en el vino tinto, en vegetales como el jitomate, la zanahoria, la soya; o bien en las frutas como los cítricos en donde tenemos el caso de la toronja (16).

## TORONJA

### Origen

Los cítricos se originaron hace unos 20 millones de años en el sudeste asiático. Desde entonces han sufrido numerosas modificaciones debidas a la selección natural y a las hibridaciones tanto naturales como las producidas por el hombre.

La dispersión de los cítricos desde sus lugares de origen se debió fundamentalmente a los grandes movimientos migratorios: las conquistas de Alejandro Magno, la expansión del Islam, las cruzadas, el descubrimiento de América, etc.

La toronja es una hibridación natural que se dio en las islas Barbados en el siglo XVII, entre un naranjo dulce y un pummelo (*Citrus grandis*).

### Taxonomía y morfología

-Familia: *Rutaceae*.

-Género: *Citrus*.

-Especie: *paradisi*

-Porte: Reducido. Tronco corto y copa compacta. Brotes color púrpura. Escasa espinosidad.

-Hojas: medio-grandes, algo vellosas, con alas grandes, nervios muy marcados y olor típico.

-Flores: grandes de color verdoso y estambres reducidos.

-Fruto: Hesperidio. Consta de: exocarpo (flavedo: presenta vesículas que contienen aceites esenciales), mesocarpo (albedo: pomposo y de color blanco) grueso y endocarpo (pulpa: presenta tricomas con jugo) blanco, rosa o rojo. De tamaño grande y forma redonda y algo aplastada. Superficie con glándulas prominentes con aceites (21).

Las variedades de toronja pueden clasificarse en dos grupos. En el primer grupo se incluyen las variedades blancas o comunes, la *Duncan* y *Marsh (Marsh seedles)*. En el segundo grupo se engloba las variedades pigmentadas, como la *Burgundy*, la *Ruby (Ruby red, Redblush, Henninger)*, la *Star Ruby* y la *Thompson o Pink Marsh*; que están adquiriendo mayor popularidad entre los consumidores.

### Requerimientos edafoclimáticos

Es una especie subtropical. La calidad de la toronja está asociada a una alta integral térmica. En general, la temperatura se considera el factor ambiental más importante en la incidencia sobre el color del fruto tanto externo como interno. La forma del fruto depende de la humedad relativa; las toronjas cultivadas en zonas tropicales o subtropicales tienen una forma aplanada, mientras que los cultivados en zonas más áridas tienen frutos esféricos. Requiere importantes precipitaciones (alrededor de 1.200 mm), que cuando no son cubiertas hay que recurrir al riego.

Es una especie ávida de luz para los procesos de floración y fructificación, que tienen lugar preferentemente en la parte exterior de la copa y faldas del árbol. Es muy sensible al viento, sufriendo pérdidas de frutos en precosecha por transmisión de la vibración.

En cuanto a los suelos son preferibles los arenosos o franco-arenosos, bien drenados, profundos, frescos y sin caliza, con pH comprendido entre 6 y 7. No tolera la salinidad, tanto de agua como de suelo.

### Actividad biológica

El efecto biológico del JT se empezó a estudiar a raíz de la observación de algunos pacientes que se dieron cuenta que cuando ingerían ciertos medicamentos con JT, el efecto del fármaco se incrementaba, o en otros casos disminuía, así se empezaron a estudiar las interacciones farmacológicas del JT llegando a la hipótesis de que tenía algún efecto sobre el citocromo P450, ya que los medicamentos con los que interactuaba se biotransformaban en la isoenzima CYP3A4.

A partir de ese echo la curiosidad de varios investigadores se incrementó, hasta llegar al campo de la Genética toxicológica donde se estudio el efecto del JT sobre el citocromo P450 ya que en ésta superfamilia se biotransforman una gran cantidad de mutágenos (21). Actualmente se siguen estudiando los posibles mecanismos de acción antigenotóxica del JT, por otro lado existen algunos y antecedentes que han demostrado individualmente efecto antigenotóxico de varios de sus componentes y del jugo completo, pero aún están en etapa experimental. A continuación se dan los principales mecanismos estudiados.

### Actividad antigenotóxica

El JT tiene contiene varios flavonoides y furanocumarinas que han demostrado tener la capacidad de inhibir preferentemente algunas familias de isoenzimas del citocromo P450, específicamente a las CYP3A4 y CYP1A2 (21), el principal flavonoide en el JT es la naringina, de la cual se ha visto un efecto inductor sobre la Cyp3a4 (22). De tal forma que al tener cierto efecto en estas enzimas la biotransformación de genotóxicos indirectos no se lleva acabo pudiendo ser eliminados sin que lleguen a ejercer su daño al ADN con toda su capacidad.

## Actividad antioxidante

Otro mecanismo propuesto del jugo de toronja contra agentes genotóxicos es el que adquiere por su capacidad como antioxidante que, como se ha mencionado, la genotoxicidad provocada por agentes oxidantes como los RL al ADN es un mecanismo de acción muy común para muchos de estos agentes.

El JT contiene varias sustancias que por separado han demostrado ser antioxidantes, tal es el caso de las vitaminas, A, C y E, ácidos hidroxicinámicos como el telúrico, sinápico, p-cumárico y caféico, así como oligoelementos como el Fe, Zn, Cu, Se, Mn y los propios flavonoides, como la naringina, (23,24,25,26,27). Efecto antioxidante que, dichos compuestos, pueden ejercer directa o indirectamente.

## Actividad sobre enzimas independientes del Citocromo P450

El JT puede inhibir a la 11- $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa, la cual oxida al cortisol para inactivar a la cortisona, de tal manera que en dosis altas el JT, puede producir un incremento en el efecto mineralocorticoide. Induce a la quinona reductasa en células de ratón *in vitro*, la cual tiene actividad anticancerígena. El aceite esencial de la toronja induce un incremento de la glutatión S-transferasa administrado por vía oral en ratón, enzima antioxidante que se relaciona también en procesos antimutagénicos (21).

## Actividad antimicrobiana

La actividad antimicrobiana de la toronja se encuentra principalmente en la cáscara, en extractos. Se ha probado esta actividad principalmente contra bacterias Gram-positivas ya que las Gram-negativas presentan más resistencia; también el JT ejerce actividad antimicótica ya que redujo hasta un 80% del crecimiento de *Aspergillus parasiticus*, *A.*

*toxocarium*, *A. flavus* y *A. oryzae* var. *effusus* in vitro. Además inhibió significativamente el crecimiento micelial y la germinación de esporas en *Penicillium* spp. y *Alternaria* spp.(21).

### Actividad insecticida

El aceite esencial de la toronja ha presentado un control efectivo de los gorgojos (*Callosobruchus muculatus*), así como una disminución en la producción de sus huevos. Contra la mosca común (*Musca domestica*) y el mosquito (*Culex pipiens*) ha presentado actividad insecticida contra las larvas y los adultos (21).

### Actividad farmacológica

En cerdos que ingirieron alimento suplementado con toronja se observó una reducción de la concentración sanguínea de colesterol, así como una disminución de arteriosclerosis (28,29), la explicación para tales efectos se ha atribuido a las pectinas presentes en el jugo, las cuales adsorben las grasas y otros nutrientes. Además, en otros estudios se ha demostrado que la naringina también reduce las concentraciones plasmáticas de los triglicéridos, el colesterol total y de baja densidad, sin embargo, este efecto no se observa en el colesterol de alta densidad (30).

# DAUNORRUBICINA

## Características generales

La Daunorrubicina (DAU), es un antibiótico antineoplásico producido por el hongo *Streptomyces peucetius* var. *caesius* que se aisló en forma independiente por primera vez por Di Marco, Dubost y col. en 1963. La IUPAC acepta los siguientes sinónimos: (8S-cis)-8-acetil-10-[(3-amino-2,3,6-trideoxi- $\alpha$ -L-lixo-hexopiranosil-)oxi] -7,8,9,10-tetrahidro-6,8,11-trihidroxil-1-metoxi-5,12-naftacenediona; daunomicina, leucaemomicina, C, cerubidina y rudidomicina. Su fórmula es  $C_{27}H_{29}NO_{10}$  y tiene un peso molecular de 527.53 g/mol, y un pka de 8.2. Como antibiótico antracíclico posee una estructura de anillo de tetraciclina con un azúcar, la daunosamina, unida por un enlace glucosídico (figura 5). Por su estructura quinona- hidroquinona, puede actuar como agente donador y receptor de electrones, teniendo su actividad antitumoral por reducción de un electrón en su estructura quinona, la cual puede ser catalizada por varias enzimas o reducida químicamente por agentes tales como borohidruro de sodio para formar el radical semiquinona, el cual, en presencia de oxígeno molecular propicia la formación de las ERO, (31; 32,33).

La DAU es muy útil en el tratamiento de leucemias linfocítica y granulocítica agudas, se encuentra entre los fármacos más activos para tratar la leucemia linfoblástica aguda en adultos, en niños se ha visto una gran actividad en tumores sólidos y linfomas; actualmente la DAU liposómica ha tenido excelentes resultados contra tumores malignos derivados de complicaciones en pacientes con SIDA en especial en el sarcoma de Kaposi.

Los efectos indeseables se muestran, esencialmente, en los tejidos mitóticamente activos, como los del tracto digestivo (estomatitis y ulceración aftosa, náuseas, cólicos, diarreas, etc.), la médula ósea (mielosupresión), la piel y mucosas (mucositis, alopecia, erupciones, urticarias, etc.). Del mismo modo, ocasiona fiebre y escalofríos, convulsiones, lagrimeo, conjuntivitis, hiperpigmentación de las uñas e hiperuricemia por lisis rápida de las células atípicas. Como consecuencia deletérea más trascendente de la DAU tenemos la ejercida sobre el miocardio que pueden surgir al iniciar el tratamiento oncológico.

cardiotoxicidad aguda, o bien de manera crónica, dependiente de la dosis total acumulativa, teniendo como síntomas y signos: taquicardia, arritmia, disnea, hipotensión, derrame pericárdico e insuficiencia congestiva, que pueden conducir al paciente a miocardiopatías irreversibles (especialmente coronariopatías) (34).

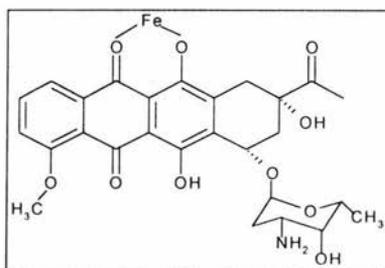
### Mecanismos de acción

Dentro de los efectos bioquímicos de la DAU se han encontrado diferentes mecanismos de acción de los cuales algunos o todos pudieran intervenir en sus manifestaciones tanto terapéuticas como cito y genotóxicas: intercalación en las bases del ADN, producción de RL, unión covalente a metabolitos reactivos, interacción con membranas y alquilación.

- **Intercalación:** En diferentes estudios han demostrado que la Dau tiene la habilidad de intercalarse dentro del ADN, forma un complejo ternario con la topoisomerasa II y el ADN, provocando errores en la replicación ó de la transcripción (35;36), pudiendo traer consigo diferentes trastornos como los intercambios de cromátidas hermanas. Estudios con rayos X y resonancia magnética nuclear, de un modelo del complejo Dau-hexanucleótido, muestran que los oligonucleótidos forman seis pares de bases a la derecha de la doble hélice con dos moléculas de Dau 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. Los sustituyentes en este anillo unen el 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 hidroxilo y carbonilo del C-9 del anillo con el sustituyente. La Dau se une a ambas hebras de la hélice de ADN, se intercala entre pares de bases adyacentes y altera la estructura cromosómica, evitando el enrollamiento y plegamiento de las hebras de DNA, prolonga el periodo G-2 del ciclo celular, reduce el índice mitótico e induce aberraciones cromosómicas (37,38).

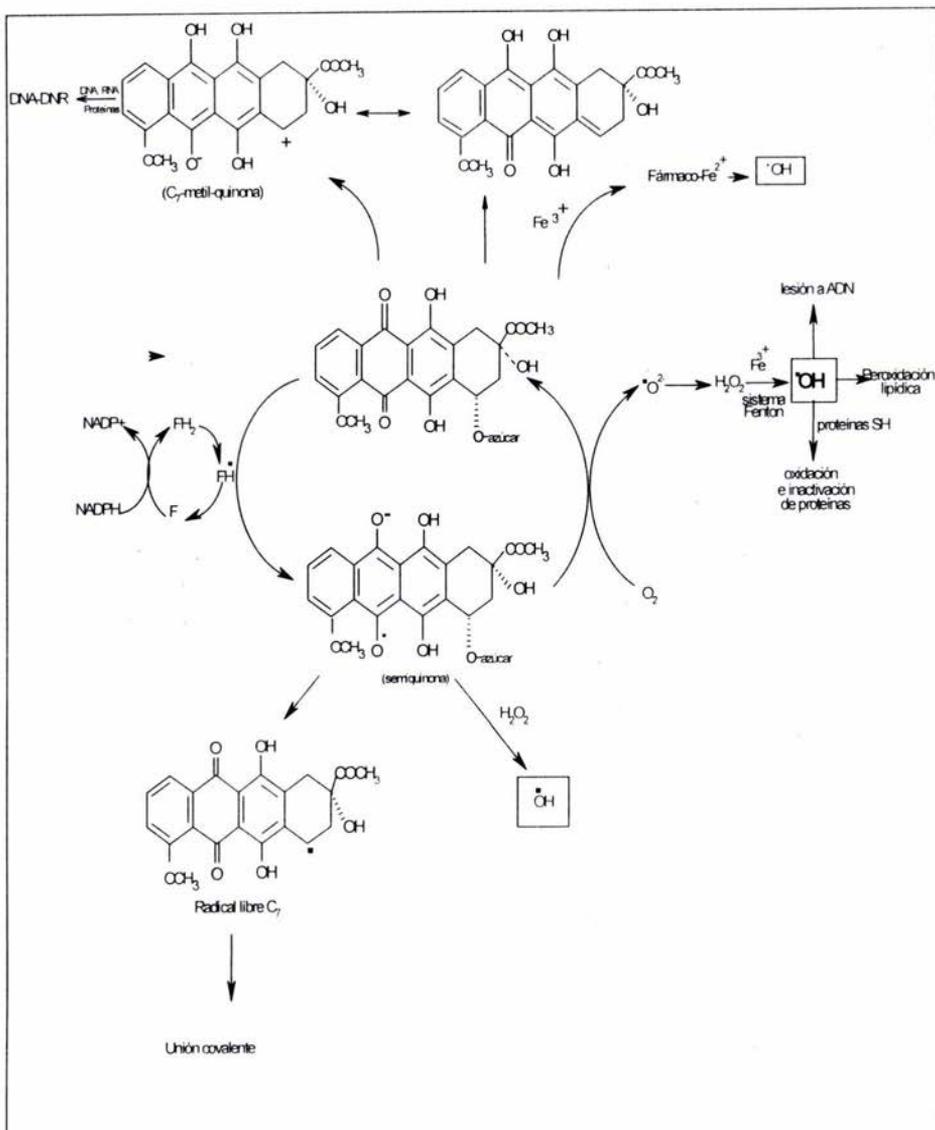
- Producción de RL: Uno de los mecanismos de daño al ADN más importante y diverso es la transferencia química de electrones. La reducción de un electrón de la antraciclina, catalizada por flavoproteínas como la NADPH-citocromo P-450 reductasa, NADH deshidrogenasa y xantina-oxidasa, produce el radical de semiquinona de la antraciclina (fig. 3) el cual puede transferir un electrón al oxígeno para regenerar la antraciclina y producir superóxido ( $\cdot\text{O}_2$ ). Ambos, el superóxido y los radicales aniones de semiquinona de la antraciclina pueden generar el radical hidroxilo ( $\cdot\text{OH}$ ) (fig. 4). Este ciclo de reducción puede ocurrir en el citoplasma (xantina-oxidasa), mitocondria (NADH deshidrogenasa), retículo endoplasmico (NADPH citocromo p-450 reductasa) y núcleo, así como también por las bacterias de nuestra flora normal mediante el ciclo enterohepático. Cuando se une al ADN nuclear, la Dau puede ser metabólicamente activada para producir radicales libres que dañan al ADN. Otra prueba que respalda el papel de los radicales libres en la cardiotoxicidad inducida por antraciclinas es el efecto protector de los recolectores de radicales libres como el alfa-tocoferol y la coenzima Q, que inhiben la cardiotoxicidad sin interferir con el efecto antitumoral de la Dau (39).
  - La formación del complejo férrico es un mecanismo de formación de radicales libres dependiente de la quelación de iones metálicos, particularmente con el hierro. Por ser una hidroxiantraquinona, la Dau tiene una alta afinidad por el hierro inorgánico, Fe(III) y tiene capacidad para formar el complejo de coordinación Dau-Fe(III) en sistemas biológicos (fig 2), el cual se auto-reduce a Dau-Fe(II) y en presencia de oxígeno se oxida a Dau-Fe(III) y forma el radical superóxido, que se dismuta a  $\text{H}_2\text{O}_2$  entra a la reacción de Haber-Weiss o Fenton (fig. 4) catalizada por el radical Dau-Fe(II) y formar el  $\cdot\text{OH}$ . Otro mecanismo de formación de radicales libres dependiente del complejo Dau-Fe(III) involucra la interacción del complejo con sistemas reductores. El complejo Dau-Fe(III) puede ser reducido enzimáticamente por flavoproteínas como la NADPH- citocromo P-450 reductasa o por el glutatión (GSH) a Dau-Fe(II), esto es, sin una

semiquinona intermediaria, y reaccionar con oxígeno para formar un radical superóxido, el cual, después de la dismutación a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, prosigue con la reacción de Haber-Weiss (fig. 4) catalizada por el complejo Dau-Fe(II) y forma radicales hidroxilo, los cuales provocan ruptura de cadenas de ADN (40). En resumen, la interacción de la Dau con el hierro estimula notablemente la producción de radicales libres. Además, las reacciones de transferencia de electrones intramoleculares, propias de los intermediarios semiquinónicos generan otros radicales, y por ello surgen agentes de alquilación.

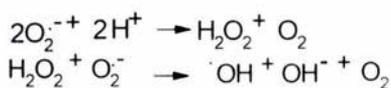


**Figura 2.** Complejo Fe(III)-daunorrubicina (40).

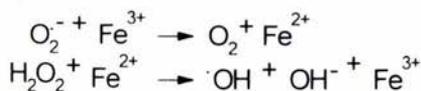
- Alquilación: En ausencia de oxígeno la semiquinona es convertida a su metabolito C7-desoxiaglicona, el cual no es farmacológicamente activo. Sin embargo, su tautómero, la C7-metilquinona es un agente alquilante de ADN (fig 3) (39).
- Interacción con membranas: Esta antraciclina también puede reaccionar con las membranas celulares, especialmente con los lípidos, alterando sus funciones; lo cual está muy ligado a su actividad antitumoral y a su cardiotoxicidad, ya que se producen RL derivados de la lipoperoxidación.



**Figura 3.** Mecanismos de activación de la daunorubicina, formación de radicales libres y sus implicaciones biológicas.



Reacción de Haber-Weiss



Reacción de Fenton

**Figura 4.** Formación del radical hidroxilo

## Farmacocinética

La DAU se administra generalmente por vía intravenosa y desaparece rápidamente del plasma humano. Las principales reacciones involucradas en el metabolismo de la DAU en humanos se presentan en la figura 5. El principal paso metabólico es su reducción a daunorrubicinol, un agente citotóxico activo, esta reducción es catalizada por aldo-ceto reductasas citoplasmáticas dependientes de NADPH encontradas en todos los tejidos analizadós. La DAU y su forma reducida son sustratos de glucosidasas microsomales presentes en la mayoría de los tejidos. Estas enzimas hidrolizan a la DAU en agliconas inactivas y el aminoazúcar libre. Las agliconas son demetiladas, conjugadas con sulfatos y ésteres glucorónido, y excretados principalmente en la bilis y la orina. Después de la inyección intravenosa, los niveles plasmáticos de DAU disminuyen rápidamente conforme el fármaco es distribuido en los tejidos. La curva de desaparición de la DAU es trifásica, con un  $t_{1/2}$  inicial de unos 12 minutos, un  $t_{1/2}$  intermedio de unas 3.3 horas y un valor terminal aproximado de 30 horas. Hay rápida acumulación fármaco en el corazón, los riñones, los pulmones, el hígado y el bazo, pero no parece cruzar la barrera hematoencefálica (35).

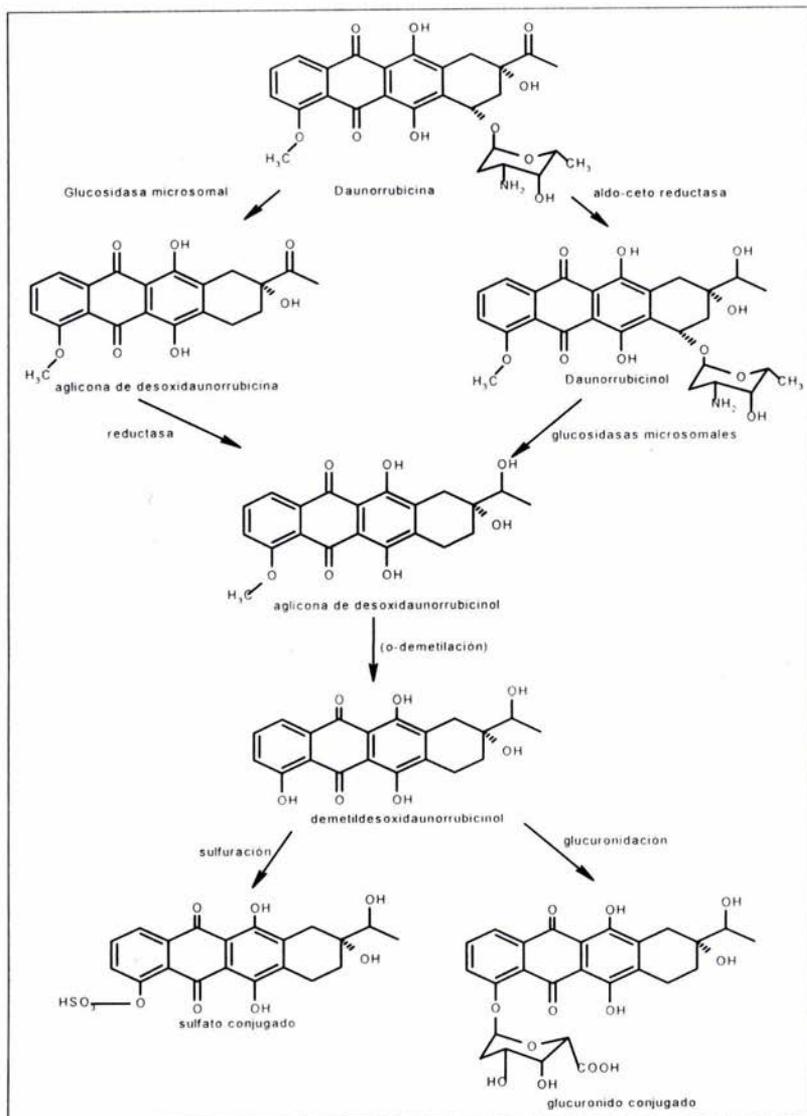


Figura 5. Principales rutas metabólicas de la daunorubicina en humanos.

## INTERCAMBIOS DE CROMÁTIDAS HERMANAS

Para detectar las mutaciones y por ende el efecto de los agentes genotóxicos y antígenotóxicos se han empleado diferentes sistemas de prueba, las cuales son casi tan numerosas como los daños que se desean detectar en el material genético. por ejemplo, dentro de las pruebas citogenéticas se encuentran las aberraciones cromosómicas, donde se detectan los cambios morfológicos de los cromosomas, por otro lado los métodos de ingeniería genética permiten distinguir hasta el error en una sola base de la secuencia en el ADN.

### Definición

La prueba de intercambios de cromátidas hermanas (ICH), es una técnica muy útil para detectar compuestos genotóxicos, ya que se puede evaluar el daño al ADN mediante el incremento en la frecuencia de ICH, que se pueden definir como el intercambio de segmentos homólogos o casi homólogos, simétricos y equivalentes entre las cromátidas de un mismo cromosoma (41).

### Antecedentes

La primera en percatarse de la existencia de los ICH fue McClintock en 1938, cuando observó que los cromosomas en anillo podían, eventualmente, originar anillos dicéntricos. Fue en 1958 cuando Tylor y col. demostraron y publicaron la existencia de ICH usando timidina tritiada durante el primero de dos ciclos de división sucesivos, en las células de la raíz de *Crepis capularis* (42). analizando citológicamente las microautorradografías observaron intercambios de segmentos entre una cromátide marcada y otra no marcada. Años más tarde los intentos para detectar la síntesis de ADN, y junto con ella a los ICH, se basaron en la incorporación en el ADN de un átomo pesado y polarizable como el bromo en forma de un análogo de base, la 5-BrdU, que pudiera ser detectado por la perturbación a estados excitados de dicho sustituyente y que, por tanto, mostrara las propiedades luminiscentes de él o los colorantes apropiados, unidos al ADN.

Los primeros experimentos de este tipo se realizaron a mediados de 1972 por investigadores como Latt y Sugiyama (43), centrándose en el uso de la quinacrina y sus derivados, principalmente debido a la capacidad de estos compuestos de producir patrones de bandeado de cromosomas en metafase. Sin embargo, debido a que no había un marcado efecto entre la sustitución de la 5-BrdU y la fluorescencia de la quinacrina sólo se pudo continuar con este procedimiento hasta que Grapp y Hilwigo encontraron nuevos colorantes como los bisbencimidazoles. Más tarde se comprendió que dichos bisbencimidazoles al unirse al ADN podían ser reducidos por la sustitución de 5-BrdU y que dicho efecto podría servir para la detección citológica de la incorporación y por tanto de la síntesis de ADN. Poco después se observó que la emisión de fluorescencia del H $\ddot{o}$ chst 33258 al unirse a la 5-BrdU incorporada al ADN era inestable a la iluminación repetida y que las células sustituidas con 5-BrdU y expuestas al colorante eran claramente sensibles a la luz.

Debido a que el método original de Latt requería entonces un microscopio de fluorescencia y que además esta fluorescencia se extingue rápidamente, Perry y Wolf en 1974 propusieron un nuevo método utilizando además de la 5-BrdU, el colorante de Giemsa y la exposición de las preparaciones a un buffer caliente de citratos saturada, con esto obtienen preparaciones que duran mucho tiempo y que no requieren microscopio de fluorescencia, en donde se pueden observar en células en mitosis de un segundo ciclo celular a partir de la incorporación de 5-BrdU los intercambios entre cromátidas hermanas teniendo una cromátida mejor teñida que la otra (42).

### Formación de los intercambios de cromátidas hermanas

Hasta la fecha, no está claro el significado biológico ni el mecanismo de formación de los ICH, aunque en la mayor parte de las células se encuentran en forma basal, en los humanos el intervalo varía de entre 2 a 20 ICH/metafase con una media de 5 a 8 (1). Especialmente los agentes productores de rupturas, aductos, uniones cruzadas y los implicados directa o indirectamente en con el proceso de replicación son los que aumentan la frecuencia de ICH. Se ha observado que los agentes que funcionan durante la fase S del ciclo celular son buenos productores de ICH, fenómeno que se correlaciona con la

producción de mutaciones puntuales y de citotoxicidad. Por otra parte, aquellos agentes que provocan una inhibición del inicio del replicón en la misma fase del ciclo producen una baja frecuencia de ICH (44).

La existencia de ICH en una célula comienza durante la fase de síntesis de ADN, cuando se termina esta etapa se observan cromosomas bivalentes y se mantienen en  $2n$  hasta la división de la célula en la cariocinesis. Durante la replicación el ADN está más expuesto, por consiguiente es cuando se le puede causar mayor daño. Existen mecanismos especializados encargados de proteger o bien reparar algún error en la síntesis del ADN, ya sean espontáneos o inducidos por agentes genotóxicos, algunos de ellos son los involucrados en las rupturas de doble cadena, como la reunión de terminaciones no homólogas, el alineamiento de cadenas sencillas o la recombinación homóloga que actúa en la fase S tardía y G2. La mayoría de las aberraciones cromosómicas provienen de la formación de rupturas de doble cadena por la reparación inapropiada (45).

En una revisión que realizaron Tice y Hollander en 1989 (46), se encontraron varias hipótesis de la formación de los ICH, en donde, el más aceptado hasta la fecha es el propuesto por Robert B. Painter en 1980 al que llamó el modelo de Replicación de ICH basado en la idea que los rompimientos de doble cadena son generados en la conjunción entre un replicón completamente duplicado y otro parcialmente duplicado. Painter sugirió que el daño que involucra la detención en la progresión de los orígenes de replicación provoca una sincronía en la replicación de dichas unidades lo que incrementa la posibilidad de dobles rupturas después de que una unidad haya terminado su replicación (47). A partir de esta teoría se ha podido inferir la participación de diferentes enzimas o proteínas involucradas en la replicación ( Helicasa, Topoisomerasa II, ADN-polimerasa, etc) que pudieran dar origen a los ICH ya sea por la acción errónea de una de ellas, o de varias secuencialmente.

Otra hipótesis, trata de explicar la formación de ICH desde un punto fisiológico, donde se encuentran implicados los genes RAD, los cuales dan origen a proteínas como la Rad 51, Rad 52, Rad 54, involucradas en la reparación de daños de rupturas de doble

cadena por medio de la recombinación homóloga. Se ha probado en ratones Knock-out que cuando se carece del gen RAD 54, los embriones son más sensibles a la radiación ionizante y a los agentes alquilantes ya que la proteína que codifica es necesaria para el proceso de reparación. Con esto nos sugieren que el entrecruzamiento de las cromátidas hermanas proveniente de la recombinación homóloga, no produce rearrreglos deletéreos en el cromosoma, es un evento común que se prefiere al entrecruzamiento con el cromosoma homólogo, ya que esto puede acarrear pérdidas de heterocigocidad por conversión génica. Los entrecruzamientos entre las cromátidas hermanas resultan en un ICH a nivel cromosómico (48).

## FUNDAMENTO

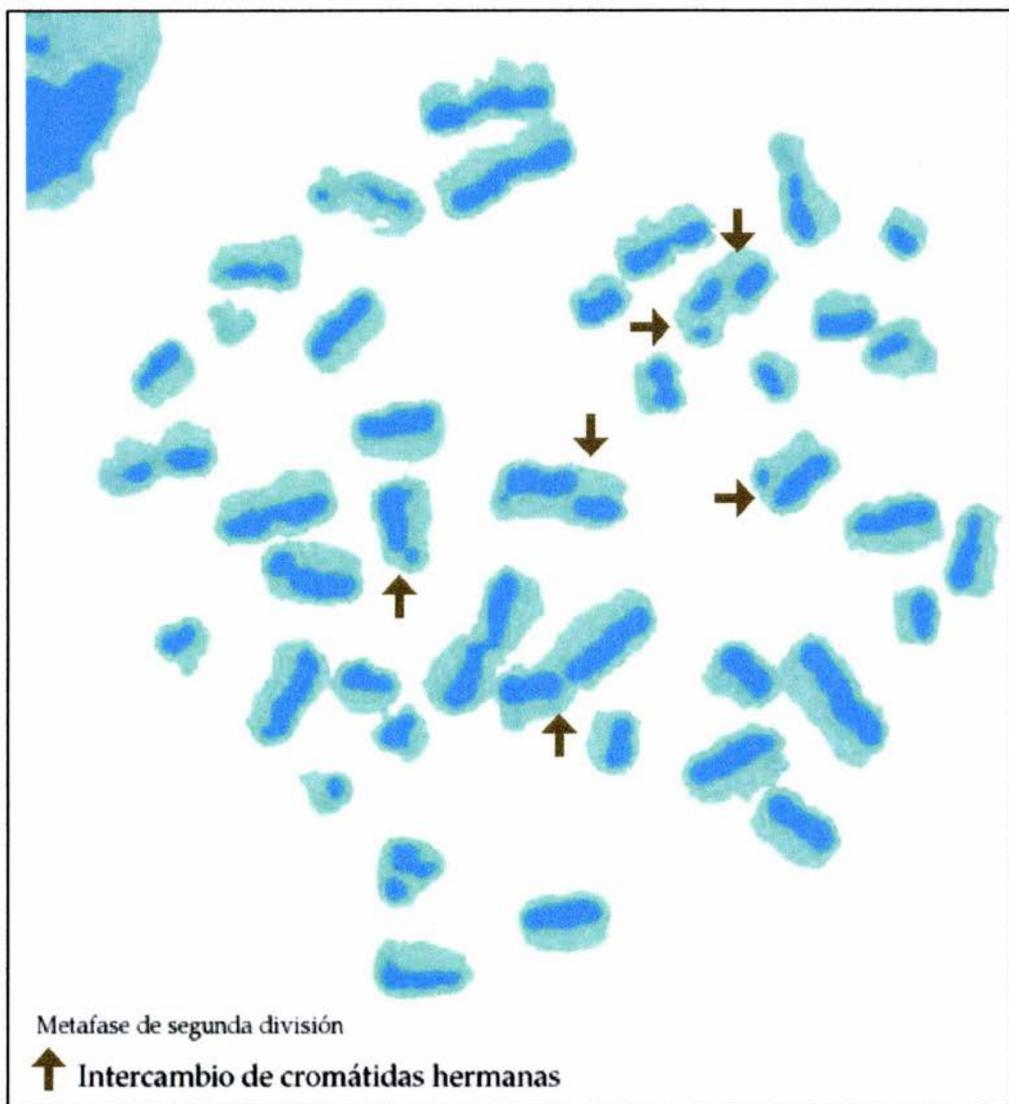
Es posible evidenciar citológicamente la presencia de los ICH mediante una tinción diferencial de las cromátidas hermanas, siempre y cuando la célula se encuentre en metafase; esto se logra, mediante la incorporación de la 5-BrdU, la cual es análogo de la timina con basa a la propiedad del ADN de replicarse semiconservativamente, así en un primer ciclo de división celular, detenido en metafase, los cromosomas bivalentes tienen una cadena de ADN sustituido con 5-BrdU y otra normal, después de dos ciclos de división se obtienen cromosomas que presentan en una de sus cromátidas las dos cadenas de ADN substituidas con 5-BrdU, mientras que en la otra cromátida se mantiene una cadena de ADN con timina, es decir, sin 5-BrdU; por último en una tercera división se tienen varios cromosomas con sus dos cromátidas substituidas completamente con 5-BrdU y algunos cromosomas iguales a los de segunda división.

Al tener a las metafases con estas condiciones se adiciona el fluorocromo Hoescht 33258, que se compleja con la 5-BrdU creando un compuesto fotosensible, exponiéndose después a luz ultravioleta produciendo una fotólisis, para así teñirlos con el colorante de Giemsa, lo que da como resultado un patrón de tinción específico pudiendo diferenciar a las cromátidas que contienen una cadena normal de ADN (más teñida) de las cromátidas que tienen sus dos cadenas de ADN substituidas con 5-BrdU (menos teñida), de tal manera que

es posible diferenciar a las metafases de primer a, segunda y tercera división (figura 6), así como los ICH en metafases de segunda división (figura 7).



**Figura 6.** Cromosomas teñidos diferencialmente.



**Figura 7.** Intercambios de cromátidas hermanas.

## JUSTIFICACIÓN

Los seres vivos estamos expuestos constantemente a la acción de diversos agentes genotóxicos, los cuales pueden llegar a ocasionar múltiples afecciones como el desarrollo de enfermedades crónico degenerativas, entre ellas el cáncer, razones por las cuales es necesario identificarlos y caracterizarlos, para así establecer estrategias eficientes con el fin de evitar y/o reducir el daño genético. El uso de sustancias de uso común que protejan al ADN, puede ser una opción eficaz y sencilla de implementar, aunque como cualquier antígenotóxico, aunque existen limitantes para su uso, como son su especificidad o su dosis, de tal manera es importante estudiarlos para conocer contra que tipo de mutágenos ejercen su efecto, poder establecer en un futuro la dosis terapéutica, y así evaluar globalmente los riesgos y beneficios en su uso.

Considerando que el jugo de la toronja contiene sustancias que individualmente han demostrado poseer actividad antimutagénica, y que no se han realizado estudios que evalúen la capacidad antígenotóxica del JT como una mezcla compleja, que es como se consume, propusimos este estudio.

Además, el JT es un claro candidato para capturar radicales libres, en vista de que posee gran cantidad de vitaminas, en especial la vitamina C, polifenoles y elementos traza, cuya capacidad antioxidante se ha confirmado individualmente. Considerando estos datos es que se seleccionó a la daunorrubicina para determinar si su genotoxicidad puede inhibirse con la toronja hecho que indicaría la participación de su mecanismo de acción como antimutágeno.

## OBJETIVOS

### GENERAL

- Evaluar la antigenotoxicidad y anticitotoxicidad del jugo de toronja frente al daño ocasionado por la daunorrubicina.

### PARTICULARES

- Determinar la genotoxicidad generada por la daunorrubicina mediante la frecuencia de intercambios de cromátidas hermanas.
- Determinar la citotoxicidad producida por la daunorrubicina mediante la evaluación del índice mitótico y el tiempo promedio de generación.
- Establecer la antigenotoxicidad del jugo de toronja sobre el daño ocasionado por la daunorrubicina.
- Evaluar el efecto anticitotóxico del jugo de toronja al enfrentarlo a la daunorrubicina.

# METODOLOGÍA

## ELABORACIÓN DE REACTIVOS Y SOLUCIONES

Jugo de toronja: se ocupó para el experimento una sola toronja (*Citrus padisi* var *Ruby Red*), proveniente de Albercías Veracruz. La extracción del jugo se hizo cortando con un cuchillo de plástico una parte de la cáscara lo suficientemente grande para extraer sólo un gajo de la toronja, al extraerlo se exprimió con ayuda de una gasa obteniendo así su jugo, el cual se utilizó únicamente para la administración de un lote experimental, posteriormente se extrajeron los gajos necesarios para los demás lotes teniendo la precaución de tomar los gajos no expuestos a la luz ni al aire.

Comprimidos de 5-bromo-2'-desoxiuridina (5-BrdU): se utilizó el reactivo comercial de la empresa SIGMA; se pesaron 45 g del compuesto para cada comprimido, los cuales se realizaron con una prensa manual ejerciendo una presión de 28 lb por 3 segundos para posteriormente recubrirlos de parafina en un 60% aproximadamente de su superficie. Los comprimidos fueron hechos un día antes de empezar el experimento manteniéndolos protegidos de la luz.

Daunorrubicina: se utilizó el medicamento comercial Rubilem<sup>®</sup> del laboratorio Lemery, presentación liofilizada solución inyectable que contiene 20 mg de clorhidrato de daunorrubicina, a partir de la cual se realizaron los pasos correspondientes para administrar a los ratones la dosis de 1 mg/kg de peso.

Colchicina: se utilizó el reactivo comercial de Sigma C-9754, de la cual se preparó una solución de 900 µg/mL, para administrar una dosis de 7.5µg/g de peso a los ratones por vía intraperitoneal en agua destilada.

KCl: se preparó una solución de 0.075M al disolver 1.3979 g de la sal de KCl de Sigma en 250 mL de agua destilada.

Solución de H $\ddot{o}$ echst: se utilizó el fluorocromo de Sigma 32258, del cual se preparó una solución de concentración  $10^{-4}$ M, de esta solución se tomó un mL y se le adicionaron 9 mL de agua destilada y 10 mL de buffer de diferenciación; con esta última solución se realizó la tinción diferencial.

Buffer de diferenciación: se disolvieron 1.18 g de citrato trisódico dihidratado en 50 mL de agua destilada, y se tituló hasta un pH de 7 con una solución de fosfato de sodio monobásico preparada con 1.221 g de en 10 mL de agua.

Giemsa: se tomaron 5 mL del colorante 9204 de Merck, junto con 5 mL de buffer de fosfatos a pH= 6.8 y 40 mL de agua destilada.

## MÉTODO

Para realizar la técnica de intercambios de cromátidas hermanas (ICH), se utilizaron ratones machos de la cepa NIH de 23 a 25 g de peso, los cuales fueron donados por el Instituto Nacional de Higiene, SSA. Los animales estuvieron en observación en las instalaciones del Laboratorio de Genética durante un periodo de 7 días antes de iniciar el experimento; en este tiempo y durante el experimento los ratones se mantuvieron en cajas metálicas con cama de aserrín, confinados en un cuarto con temperatura controlada entre 21 y 24 °C, y tuvieron libre acceso al alimento y agua. Los animales se dividieron de forma aleatoria en 6 lotes con 5 ratones cada uno como se muestra en la Tabla I.

Tabla I. Administración de los lotes experimentales.

<b>LOTE</b>	<b>COMPUESTO 1</b>	<b>DOSIS (<math>\mu\text{L/g}</math>)</b>	<b>COMPUESTO 2</b>	<b>DOSIS (mg/kg)</b>
1	Agua	-	-	-
2	-	-	DAU	1
3	Jugo de toronja	41.6	-	-
4	Jugo de toronja	4.1	DAU	1
5	Jugo de toronja	20.8	DAU	1
6	Jugo de toronja	41.6	DAU	1

Al inicio del experimento, a los ratones del primer grupo se les administró por vía oral agua destilada para así fungir como testigo negativo, un grupo más se trató con DAU, vía intraperitoneal (1 mg/kg), es decir el testigo positivo. A otro grupo sólo se le administró JT (41.6  $\mu\text{L/g}$ ), mientras que a los tres grupos restantes se les administró el jugo de toronja vía oral en las dosis de 4.1, 20.8 y 41.6  $\mu\text{L/g}$  más DAU (1 mg/kg) una hora después vía intraperitoneal respectivamente. Treinta minutos después de la administración de la DAU, se anestesió a cada ratón con éter por inhalación, y se procedió a realizar una pequeña incisión en la región lateral del ratón, entre el 4° y 5° espacio intercostal, para implantar subcutáneamente la tableta de 5-BrdU; por último, se colocó una grapa en el lugar de la incisión para evitar la salida de la tableta. A las 22 horas de implantada la tableta de 5-BrdU, se les administró colchicina por vía intraperitoneal a una dosis de 7.5  $\mu\text{g/g}$ . Concluidas las 24 h del implante, los ratones fueron sacrificados por dislocación cervical e inmediatamente se les disectaron ambos fémures con la finalidad de obtener su médula ósea, la cual fue extraída mediante una solución hipotónica de KCl 0.075 M a 37°C, donde permanecieron en incubación por una hora.

## Obtención de metafases

Al término de la incubación, los tubos se centrifugaron a 1500 rpm durante 10 minutos y se retiró el sobrenadante. Se resuspendió el paquete celular realizando la fijación con 8 mL de una solución de metanol-ácido acético (3:1). Se repitió la fijación 2 veces más.

Las preparaciones cromosómicas se realizaron sobre portaobjetos perfectamente limpios y desengrasados con etanol, dejándoles caer dos o tres gotas de la suspensión celular a una altura aproximada de 60 cm, secándolas inmediatamente por flameo (de 1 a 2 seg) y después al aire. Posteriormente se procedió a realizar la tinción diferencial de los ICH.

## Tinción diferencial

Se colocaron en cada laminilla 5 ó 6 gotas de la solución de H $\ddot{o}$ chst las cuales se expandieron con un cubre objetos y se mantuvieron en oscuridad por 25 minutos. Posteriormente se adicionó buffer de diferenciación alrededor del portaobjetos suficiente para humedecer toda el área del mismo. El paso siguiente fue exponer las laminillas a luz negra por 90 minutos, a una distancia no mayor de 1 cm de la lámpara. Terminado este tiempo se retiraron los cubreobjetos de las preparaciones por inmersión en un vaso de precipitados con agua destilada y los portaobjetos se secaron al aire.

Las laminillas se sumergieron en solución salina de citratos a 60°C por 15 minutos, se enjuagaron por inmersión en agua caliente y luego en fría, secándolas al aire. Por último se tiñeron con el colorante Giemsa preparado durante 12 minutos.

## Análisis microscópico

Para cada uno de los ratones en estudio se llevó a cabo el siguiente análisis microscópico:

- Determinación de la frecuencia de ICH en 30 metafases de segunda división.

- Evaluación de la cinética de proliferación celular (CPC) en 100 metafases contabilizando el número de mitosis en primera, segunda y tercera división; para posteriormente calcular el tiempo promedio de generación (TPG).

- Evaluación del índice mitótico (IM), contabilizando las células en división dentro de 1000 células.

Por último se realizó el análisis estadístico con la prueba de análisis de varianza (ANOVA  $\alpha=0.05$ ) y la prueba de comparaciones múltiples Tukey-Kramer.

# RESULTADOS

## ENSAYO ANTIGENOTÓXICO

El parámetro que se cuantificó en este ensayo fueron los ICH, los cuales se ha demostrado ampliamente que se pueden inducir por agentes tóxicos para el ADN, en especial aquellos que forman aductos, rupturas y/o que interfieran con la replicación, por lo que es un parámetro muy útil para detectar compuestos mutagénicos (41). La frecuencia de ICH se cuantificó en 30 células de la médula ósea en las metafases que se encontraron en el segundo ciclo celular por ratón, valores que se reportan en la figura 8.

Con lo que respecta al lote administrado sólo con agua destilada, se puede observar que presentó una frecuencia de ICH promedio de 2.808 por metafase, valor que se encuentra dentro del valor normal de ICH, por lo que es un buen modelo para ser tomado como testigo negativo (TN) para el experimento.

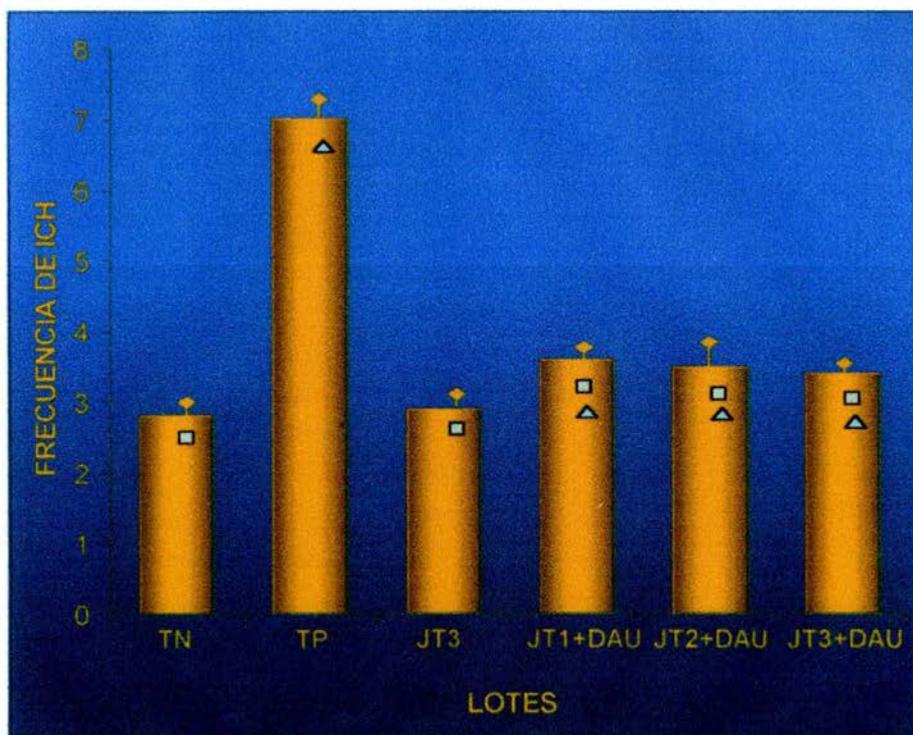
Referente al lote administrado con JT en la dosis más alta utilizada la cual fue de 41.6  $\mu\text{L/g}$ , se obtuvo una frecuencia promedio de ICH de 2.89, el cual es muy similar al del TN y no se encontraron diferencias estadísticamente significativas, lo que sugiere que el JT en la dosis citada no fue capaz de incrementar la frecuencia de ICH, es decir, no ejerció un efecto genotóxico.

Por otro lado, en el caso del lote tratado con una dosis de 1mg/kg de peso de DAU, se observó una diferencia estadísticamente significativa con respecto al valor basal, ya que incrementó la frecuencia de ICH en un 242 % con respecto al TN, obteniendo un valor promedio de 6.9 ICH por célula, comprobándose con esto la genotoxicidad de éste antineoplásico ya reportada. Con lo anterior se pudo utilizar para el ensayo éste lote como testigo positivo (TP) al haber ejercido la DAU a la dosis administrada su efecto genotóxico significativamente.

Con respecto a los resultados obtenidos para los lotes problema administrados con DAU y diferentes dosis de JT se comportaron de una manera muy similar: no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre ellos. por el contrario las diferencias se presentaron al compararlos con el TP y TN. como se describe a continuación.

El lote administrado con DAU y la dosis más baja de JT ( 4.1 $\mu$ L/g), presentó un valor promedio de ICH de 3.606. lo que representó una disminución de la frecuencia de ICH del 77.87 % con respecto al aumento provocado por el TP sobre el valor basal. es decir. en este lote problema el JT redujo la genotoxicidad producida por la DAU en la magnitud mencionada. Para el lote administrado con DAU y JT en la dosis de 20.8  $\mu$ L/g. se observó una protección del JT en un 80.64 % con respecto al daño ejercido por el TP, al haber presentado un valor promedio en la frecuencia de ICH de 3.482 por célula. Por último el valor promedio de la frecuencia de ICH para el lote administrado con la dosis más alta de JT utilizado (41.6  $\mu$ L/g). fue de 3.394 ICH por célula. lo que representa una disminución de la genotoxicidad del 82.73 % con respecto al daño observado en el TP.

Por lo anterior, estos resultados sugieren que el JT en un intervalo amplio de dosis ejerce protección sobre el ADN.



**Figura 8**  
**Efecto del JT sobre la frecuencia de ICH en células de la médula ósea de ratón.**

(TN) testigo negativo, (TP) testigo positivo, (JT3) jugo de toronja (41.6  $\mu\text{L/g}$ ), (DAU) daunorrubicina (1mg/kg), (JT1+DAU) jugo de toronja (4.1  $\mu\text{L/g}$ ) más daunorrubicina (1 mg/kg), (JT2+DAU) jugo de toronja (20.8  $\mu\text{L/g}$ ) más daunorrubicina (1 mg/kg), (JT3+DAU) jugo de toronja (41.6  $\mu\text{L/g}$ ) más daunorrubicina (1 mg/kg).

- Diferencia estadísticamente significativa respecto al testigo positivo.
  - △ Diferencia estadísticamente significativa respecto al testigo negativo.
- Pruebas de ANOVA y Tukey-Kramer ( $\alpha = 0.05$ ).

## ENSAYO ANTICITOTÓXICO

En el ensayo anticitotóxico los parámetros que se midieron fueron el índice mitótico (IM) y la cinética de proliferación celular (CPC). Para cuantificar el IM fue necesario contar el número de células en metafase contenidas en mil células de la médula ósea, con esto se puede observar la cantidad de células que están en división, de tal manera que una disminución o un aumento en la cantidad metafases células, sugiere un efecto citotóxico ejercido sobre las divisiones celulares.

Los resultados obtenidos en el IM presentados en la figura 9, no se encontraron diferencias estadísticas significativas entre ninguno de los lotes, es decir, la DAU, el jugo de toronja y sus combinaciones presentaron un valor promedio de 26.08 metafases en mil células, de manera similar a la observada en el TN que fue de 23.8. Esto indica que el JT en sus tres dosis administradas no fue citotóxico y la DAU en la dosis utilizada no inhibió la división celular en la médula ósea, por lo tanto, no fue posible evaluar el efecto antígeno tóxico del JT con este parámetro.

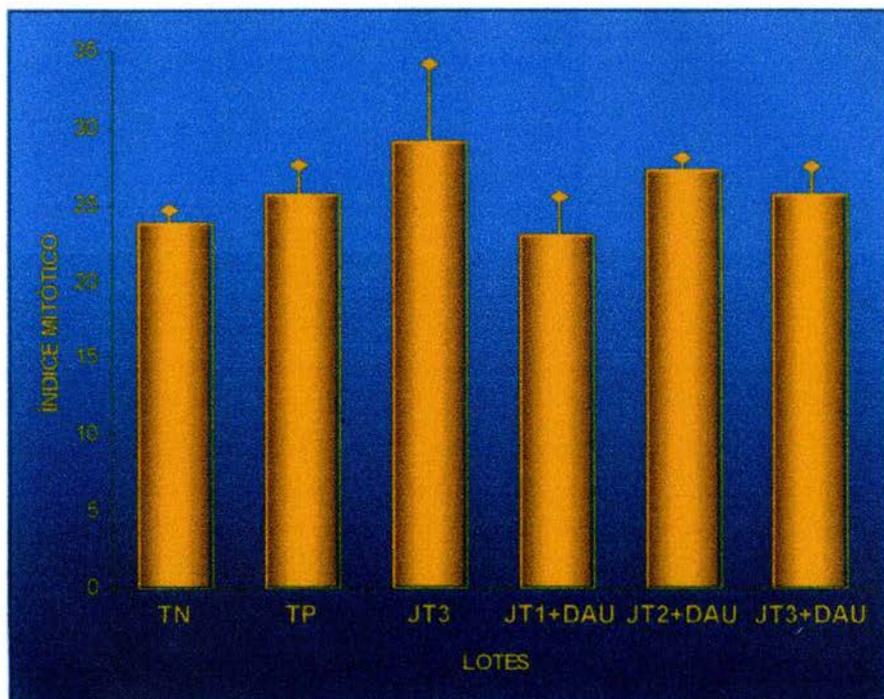
Para determinar la CPC se cuantificaron cien metafases, clasificándolas como metafases de primera, segunda y tercera división celular; con la media de éstos datos, reportados en la Tabla II, se calculó el TPG mediante la fórmula presentada en el pie de figura (figura 10), el cual representa el tiempo promedio en que las células llevan a cabo un ciclo celular, de tal manera que si las células retrasan o aceleran el TPG, por acción del mutágeno, esto indicaría citotoxicidad.

Los resultados del TPG mostrados en la figura 10 indican que el lote administrado con DAU (12.0 h), presentó un retraso estadísticamente significativo con respecto al TN (9.7 h), de aproximadamente 2 h y 20 minutos. Esto sugiere que la DAU ejerció citotoxicidad, debido a éste aumento en el TPG.

Por otra parte, en los grupos administrados con JT (4.1, 20.8 y 41.6  $\mu\text{L/g}$ ) más DAU y el grupo administrado sólo con JT (41.6  $\mu\text{L/g}$ ), el valor de TPG obtenido fue de 9.8, 9.5, 9.7 y 9.5 horas respectivamente, no presentando diferencias significativas estadísticamente con respecto al TN, lo cual sugiere por un lado que el JT la dosis más alta utilizada no ejerce efecto citotóxico, y por otro lado que el JT ejerció efecto protector contra el daño producido por la DAU en las tres dosis utilizadas.

Tabla II. Cinética de proliferación celular en células de la médula ósea en ratón.

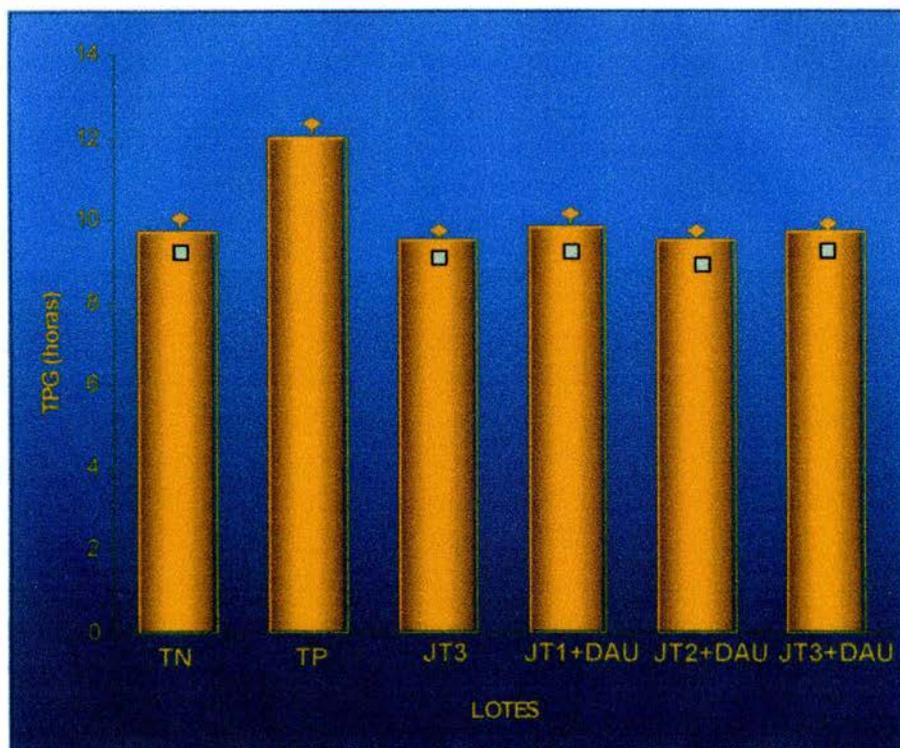
<b>LOTE</b>	<b>Metafasas de 1ª división (%)</b>	<b>Metafasas de 2ª división (%)</b>	<b>Metafasas de 3ª división (%)</b>
TN	15.8	41.6	42.6
TP	41.2	34.4	24.4
JT (41.6 mL/g)	14	40	46
JT1(4.1 mL/g) +DAU	17	40.6	42.4
JT2(20.8 mL/g)+DAU	16	39.8	44.2
JT3(41.6 mL/g)+DAU	16.4	40.6	43



**Figura 9**  
**Efecto del JT sobre el índice mitótico.**

(TN) testigo negativo, (TP) testigo positivo, (JT3) jugo de toronja (41.6  $\mu\text{L/g}$ ), (DAU) daunorrubicina (1mg/kg), (JT1+DAU) jugo de toronja (4.1  $\mu\text{L/g}$ ) más daunorrubicina (1 mg/kg), (JT2+DAU) jugo de toronja (20.8  $\mu\text{L/g}$ ) más daunorrubicina (1 mg/kg), (JT3+DAU) jugo de toronja (41.6  $\mu\text{L/g}$ ) más daunorrubicina (1 mg/kg).

No se presentaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos experimentales. Pruebas de ANOVA y Tukey-Kramer ( $\alpha = 0.05$ ).



**Figura 10**  
**Efecto del JT sobre el tiempo promedio de generación en células de la médula ósea de ratón.**

(TN) testigo negativo, (TP) testigo positivo, (JT3) jugo de toronja (41.6  $\mu\text{L/g}$ ), (DAU) daunorrubicina (1mg/kg), (JT1+DAU) jugo de toronja (4.1  $\mu\text{L/g}$ ) más daunorrubicina (1 mg/kg), (JT2+DAU) jugo de toronja (20.8  $\mu\text{L/g}$ ) más daunorrubicina (1 mg/kg), (JT3+DAU) jugo de toronja (41.6  $\mu\text{L/g}$ ) más daunorrubicina (1 mg/kg).

□ Diferencia estadísticamente significativa respecto al testigo positivo.  
 Pruebas de ANOVA y Tukey-Kramer ( $\alpha = 0.05$ ).

$$TPG = \frac{\text{No. horas de BrdU}}{(1)(M1) + (2)(M2) + (3)(M3)}$$

En donde: (BrdU) 5-bromo-2'-desoxiuridina; (M1) Metafasas de primera división (M2) Metafasas de segunda división; (M3) Metafasas de tercera división.

## DISCUSIÓN

Hasta el momento, existen suficientes evidencias para relacionar que el daño producido por diferentes xenobióticos sobre el ADN, son parte importante en el desarrollo de múltiples enfermedades, que pueden presentarse en cualquier etapa de la vida desde los daños a nivel gestacional hasta las relacionadas con el envejecimiento, como son el cáncer y los padecimientos cardiovasculares, enfermedades crónico degenerativas que son las principales causas de muerte en los seres humanos (49,50).

Dentro de los principales agresores de las biomoléculas, incluido el ADN, se encuentran los RL, los cuales al producirse dentro del organismo, ya sea por razones fisiológicas o patológicas, atacan indiscriminadamente a las biomoléculas causándoles daño, que si no es controlado a nivel molecular, celular o sistémico, el organismo entra en estrés oxidativo y eventualmente puede traducirse en los padecimientos antes mencionados.

Las ERO se encuentran dentro de los principales RL, son producidos endógenamente de manera normal, pero también pueden ser inducidos por diferentes xenobióticos, es decir agentes que pueden incrementar la formación de las ERO, de manera independiente o en conjunto con el efecto oxidante que puedan presentar por si mismos (51).

Una estrategia útil para evitar el daño causado por oxidantes, o en general el daño producido por cualquier xenobiótico, es el uso de sustancias quimioprotectoras, las cuales provienen principalmente de los alimentos. Por ejemplo, existen evidencias epidemiológicas que indican que un alto consumo de frutas y vegetales, ricos en antioxidantes, se relaciona de forma directa con una reducción en la incidencia del cáncer (2, 52). Refiriéndonos a la estabilidad genómica, la ingesta adecuada de nutrientes en la dieta es un factor determinante, ya que se ha demostrado que la deficiencia nutricional puede incrementar la incidencia de lesiones en el material genético, esto debido a que los

sustratos y los cofactores son importantes en procesos bioquímicos útiles para la protección y conservación del ADN (53).

Por lo anterior se están y se han realizado un importante número de investigaciones tanto para evaluar la capacidad protectora de varios alimentos como de algunos de sus componentes principales, tal es el caso del té verde y el negro, el café, el chocolate, la manzanilla, la clorofilina, el ácido nordihidroguayarático, etc. (54, 55, 56, 57).

Con relación al JT se ha visto que contiene sustancias que han comprobado tener capacidad antioxidante, actuando como agentes interceptores de RL y agentes electrófilos, tal es el caso de los flavonoides, terpenos, ácidos hidroxicinámicos, vitaminas y minerales(23, 24, 25, 26, 27, 51, 58); por ejemplo: la vitamina E tanto *in vivo* como *in vitro* intercepta a los radicales semiquinona e hidroxilos (59), la vitamina C *in vivo* actúa como un interceptor de radicales formando el radical hidroascorbato que es muy poco reactivo (60), por otro lado también se ha comprobado el efecto antígenotóxico de varios de sus componentes, por ejemplo: la vitamina C en dosis de 700 mg/kg redujo en un 50.04% la inducción de ICH *in vivo* por la acción de la mitomicina C (2mg/kg) (61), la naringina en dosis de 50, 250 y 500 mg/kg redujo en promedio un 46.6 % el efecto genotóxico de la ifosfamida y en un 39.5 % el efecto del metil-metanosulfonato, evaluado con la prueba de micronúcleos (21), con esta misma técnica la naringina redujo hasta en un 56 % el daño genotóxico de la DAU en dosis de 2.5 mg/kg (62), mediante el ensayo cometa; este flavonoide redujo el daño producido por la DAU en un 45 %(63), con la técnica de ICH *in vivo* y con JT, se observó una reducción del daño genotóxico hasta en un 72% contra la ifosfamida (64), y hasta en un 56 % contra el metil-metanosulfonato (65).

## ENSAYOS ANTIGENOTÓXICOS Y ANTICITOTÓXICOS

### Efecto genotóxico y citotóxico de la daunorrubicina

La DAU fue el agente mutágeno elegido para este ensayo, debido a que la mayor parte de sus mecanismos de acción son buenos inductores de ICH, y que en general ha

actuado como un buen agente inductor de cito y genotoxicidad en ensayos de este tipo (57, 62). En la clínica la DAU es utilizada para el tratamiento de leucemias (66), es decir, tiene un potente efecto citotóxico sobre la médula ósea. Por otro lado la DAU es un productor de RL, como lo son en general todas las antraciclina, familia a la que pertenece este antineoplásico (36). Se puede inferir que la producción de RL es el principal mecanismo de acción de la DAU, ya que puede ser producirlos mediante varias vías:

- Por la reducción de la antraciclina al anión semiquinona la cual en presencia de  $H_2O_2$  produce el radical  $\cdot OH$ , también en presencia de oxígeno molecular la semiquinona produce ERO, por último el radical semiquinona se puede unir covalentemente a diferentes biomoléculas, de las cuales cuando se une a las membranas provoca lipoperoxidación, proceso que también se origina por las ERO ya inducidas, produciendo radicales epóxidos, hidroperóxidos, alcóxidos y peróxidos lipídicos, todos ellos con capacidad genotóxica y citotóxica (67, 68).
- Sin una semiquinona intermediaria la DAU por ser una hidroxiantraquinona, tiene alta afinidad por el  $Fe^{3+}$  formando el complejo de coordinación DAU-Fe(III), el cual al reducirse y en presencia de oxígeno forma las ERO (39).
- La DAU al intercalarse en el ADN *per se* causa genotoxicidad, pero se sabe que la oxidación de las antraciclina puede llevarse a cabo en el citoplasma, el retículo endoplásmico, la mitocondria y particularmente en el núcleo por esta unión al ADN con lo que la DAU puede ser activada en él (38).

La dosis de DAU que se utilizó en este ensayo fue de 1 mg/kg de peso, se obtuvieron resultados satisfactorios (6,9 ICH por metafase), los cuales están de acuerdo a los datos referentes a la genotoxicidad del compuesto. Con un estudio similar evaluaron el efecto de la DAU en la misma dosis en ensayo cometa (56), y demostraron que es un compuesto genotóxico. El ensayo cometa evalúa la genotoxicidad de los xenobióticos a través de las rupturas de las cadenas de ADN. Por otro lado, Martino y cols. (62), determinaron la genotoxicidad de la DAU en una dosis de 2.5 mg/ kg de peso, con el ensayo de micronúcleos, obteniendo una inducción favorable de éstos, lo cual es congruente con nuestros resultados, debido a que los ICH es una prueba más sensible que

los micronúcleos, y por lo tanto para un micronúcleo es necesario una dosis mas alta que para producir ICH.

En la evaluación del efecto citotóxico la dosis utilizada de DAU en este experimento no fue suficiente para observar tal efecto, como se observó en los resultados: el grupo tratado con DAU presentó diferencia estadísticamente significativa con el TN en el IM, es decir, la DAU en dosis de 1 mg/kg inhibió la cantidad de metafase observadas.

Sin embargo, al evaluar la CPC y el TPG la DAU produjo un retraso en el tiempo que se lleva acabo un celular. El echo de que la DAU no afectó el IM, pero sí el TPG sugiere que la DAU en la dosis administrada (1 mg/kg) resultó ser insuficiente para producir en 24 horas un efecto citostático visible mediante el número de células en división de la médula ósea, no obstante éste efecto se empezó a dar, ya que el tiempo que están tardando las células en completar el ciclo celular es mayor, es decir, les está costendo mayor esfuerzo a las células de la médula ósea completar su proceso mitótico, pero la inducción de división de éstas sigue manteniéndose constante.

### Efecto genotóxico y citotóxico del jugo de toronja

Las dosis utilizadas del JT fueron de 4.1, 20.8 y 41.6  $\mu\text{L/g}$  de peso, lo que equivale respectivamente a 1, 5 y 10 vasos de JT consumido por un individuo de 60 kg, ahora bien, para este ensayo sólo se utilizó la dosis más alta (41.6  $\mu\text{L/g}$ ) para observar la posible citotoxicidad, así como la posible inducción de ICH que pudiera presentar, es decir la genotoxicidad, ya que en estudios previos se ha comprobado que el JT a las dosis utilizadas para este ensayo carece de dichos efectos (64, 65). De esta forma se comprobó nuevamente la condición inocua del JT en un estudio agudo.

Por otra parte, el hecho de que el JT en la dosis más alta no presentó efecto genotóxico ni citotóxico en este ensayo es muy favorable, ya que algunos compuestos que han mostrado una alta capacidad genoprotectora en dosis bajas, pero a dosis elevadas, se observa el efecto contrario, es decir, se presenta genotoxicidad, por ejemplo, la vitamina C induce la formación de ICH *in vitro* e *in vivo* y modifica la proliferación celular (69; 70): el

ácido nordihidroguayaretico incrementa ligeramente los ICH (54), flavonoides como la quercetina, el kaemferol y la genisteína funcionan como venenos para la topoisomerasa II, actúan como agentes clastógenos y favorecen la recombinación cromosómica (71), ó efectos citotóxicos como los producidos por la activación de la vía de las caspasas, lo que lleva a las células al proceso de apoptosis (72).

Sin embargo aunque a la naringina (flavonoide mayoritario en la toronja), no se le han encontrado efectos genotóxicos o citotóxicos en ensayos agudos en altas dosis (22, 63), conviene señalar que algunos compuestos contenidos en el JT si lo presentan, tal es el caso de la vitamina C, sin embargo, una explicación para nuestros resultados, donde no se observó que el JT produjera genotoxicidad en la dosis de 41.6  $\mu\text{L/g}$ , es que la concentración de vitamina C no alcanza el umbral requerido para producir genotoxicidad o citotoxicidad, en el ensayo agudo; y por otro lado, sería conveniente evaluar este factor en investigaciones futuras de tipo subcrónico o crónico, para evaluar los efectos del JT en estudios a mediano o largo plazo.

### Efecto antigenotóxico y anticitotóxico del jugo de toronja

El efecto antigenotóxico del JT contra la inducción de ICH en médula ósea producida por la DAU en este ensayo, como se puede observar en los resultados experimentales, es muy evidente, ya que en las tres dosis probadas se obtiene una protección elevada; explícitamente con la dosis de 4.1  $\mu\text{L/kg}$  disminuyó en 77.87 % la frecuencia de ICH producidos por la DAU, en la dosis de 20.8  $\mu\text{L/g}$  la inhibición fue de 80.64 % y en la dosis de 41.6  $\mu\text{L/kg}$ , el JT redujo en un 82.73 % la genotoxicidad de la antraciclina.

En términos prácticos se puede decir que la protección fue la misma para las tres dosis, o sea, se obtuvo la misma protección con la dosis más baja utilizada (equivalente a 1 vaso de jugo) así como con la dosis más alta utilizada (equivalente a 10 vasos de jugo), lo que resulta ser muy conveniente en agentes quimioprotectores, ya que por un lado se evita llegar a dosis en donde *per se*, se obtengan efectos no deseados; y por otro, se obtenga una

buena protección mediante una ingesta fácil de adquirir por costos y disponibilidad; u otra opción es en el tratamiento del cáncer con quimioterapias y radiaciones en donde los pacientes sometidos a dichos tratamientos cuando se les administran antioxidantes aparte de soportar mejor la terapia, perder menos peso y en general tener mejor calidad de vida; han demostrado tener un efecto sinérgico con el tratamiento, salvo en algunos casos específicos (73).

Se han evaluado otros antimutágenos constituidos de varios compuestos que presentan actividad antigenotóxica, tal es el caso del té verde, que contiene varias sustancias con dicha actividad, dentro de las cuales se encuentran sus flavonoides: la (-)-epigallocatequina, la (-)-epigallocatequina-3-galato y la (-)-epicatequina galato. Sin embargo el efecto antigenotóxico de los tés es mayor al de sus flavonoides evaluados por separado, lo cual ha sugerido que existe sinergismo entre estos compuestos y probablemente otras sustancias para incrementar la antimutagénesis del té (74). En este sentido es probable que en nuestro experimento se haya presentado un sinergismo entre los componentes del JT para obtener una genoprotección del 80.41 % en promedio.

Al comparar el porcentaje de inhibición obtenido con otros antimutágenos en experimentos similares al nuestro, por ejemplo, el del aceite esencial de manzanilla contra la DAU (57), la vitamina C contra la mitomicina C (61), se observa que el porcentaje de inhibición promedio para JT en este estudio, (80.41 %), es mayor que el del aceite esencial de manzanilla o la vitamina C, y si bien la inducción de ICH en esos modelos fue mayor al inducido por ambos mutágenos, es diferente la cantidad de antimutágeno utilizado para alcanzar la protección, la cual fue mucho menor en el caso del JT, que con la vitamina C o el aceite esencial, lo anterior sugiere que el JT posee una mayor capacidad antigenotóxica, en comparación con el aceite esencial de manzanilla y la vitamina C; probablemente este efecto puede deberse a un sinergismo de los componentes antioxidantes del JT, y por lo tanto éste sea más efectivo al antagonizar a los RL producidos por agentes como la DAU.

Por otro lado, no se puede atribuir todo el efecto antimutagénico del JT a su capacidad antioxidante, ya que la DAU tiene otros mecanismos de acción independientes

de la producción de RL, aunque se considera que es su principal mecanismo de citotoxicidad. La DAU también presenta la capacidad de intercalarse al ADN, y por ende puede producir errores en la replicación o bien otras alteraciones como los ICH. asimismo, puede actuar como agente alquilante generando la C<sub>7</sub> metil-quinona: en los mecanismos mencionados, es posible que el JT reduzca el daño al ADN porque se ha demostrado que algunos agentes con capacidad antioxidante la genotoxicidad provocada indirectamente por mutágenos directos. La explicación para tales efectos no ha sido demostrada por completo, no obstante, se ha sugerido que los antioxidantes inducen la producción de las enzimas de fase II involucradas en la desintoxicación de los organismos, o bien que inhiban a las enzimas de fase I, que se encargan de la activación o desactivación, según sea el caso de los mutágenos (75). En el caso particular de la DAU si se induce o hace que funcionen más eficientemente a las enzimas de la fase II por el JT se puede incrementar la detoxificación del compuesto en las células, en donde al eliminarlo de manera más eficiente, el tiempo de acción del agente genotóxico se ve disminuido, evitando en cierto grado la intercalación y/o alquilación (76), contribuyendo este proceso, a su vez con la formación de RL.

Otra hipótesis, es que los antioxidantes pueden interactuar directamente con las especies electrofílicas interceptando a los agentes alquilantes, de manera similar a lo que ocurre con los RL. En general los antioxidantes poseen una alta densidad electrónica y esto les confiere la capacidad para actuar como trampas para agentes electrófilos, en donde la alquilación se lleva a cabo sobre ellos y no sobre el material genético, impidiendo así la acción genotóxica de los compuestos (77).

Con respecto al efecto anticitotóxico del JT sólo se pudo evaluar con el tiempo promedio de generación (TPG), ya que la DAU no modificó el IM. Como se puede observar en los datos experimentales el TPG ocasionado por el TP fue mayor que el de todos los demás lotes, siendo estadísticamente significativo al compararlos con el TN, el grupo administrado con JT en la dosis de 41.6 µL/g, y los tres grupos administrados con JT en las tres dosis utilizadas más DAU. Esto sugiere de que el JT modificó en la médula ósea el retraso en el ciclo celular producido por la DAU, no obstante, existen otras pruebas más específicas que el TPG para evaluar la citotoxicidad, tal es el caso del la prueba basada en

la transformación de la sal de tetrazolio MTT (3-(4,5-dimetiazol-2-il)-2,5-bromo difeniltiazolio) que es un colorante amarillo soluble en agua en un producto color púrpura (formazan) por la enzima mitocondrial succinato deshidrogenasa, éste es un ensayo de microtitulación basado en la capacidad metabólica en donde la transformación es realizada sólo por las células vivas y la cantidad de formazan producido es proporcional al número de células presentes (78); prueba que se podría aplicar en un futuro ya que se tienen indicios de que la citotoxicidad ejercida por la DAU no es eliminada por compuestos contenidos en el JT, como por ejemplo la naringina (62).

Por todo lo anterior, este estudio proporciona información acerca de la capacidad antigenotóxica y anticitotóxica del JT al enfrentarlo a un agente productor de RL, sin embargo, es necesario realizar otros estudios tanto genotóxicos, como de otras áreas de investigación, donde se identifiquen los mecanismos mediante los cuales el JT ejerce su efecto genoprotector, y confirmar su efecto citoprotector, para proponerlo como antimutágeno a la población en general.

## CONCLUSIONES

La DAU es un agente genotóxico en la dosis de 1 mg/kg, ya que incrementó 256 % la frecuencia de ICH.

La DAU es un agente citotóxico en la dosis utilizada ya que aumento el TPG en aproximadamente 2 horas y 20 minutos con respecto al valor basal.

El JT es un agente antígenotóxico en las dosis de 4.1, 20.7 y 41.6  $\mu\text{L}/\text{kg}$  debido a que disminuyó en un 77.87, 80.64 y 82.73 % respectivamente, la frecuencia de ICH producidos por DAU.

El JT es un agente anticitotóxico en las dosis mencionadas porque disminuyó el TPG producido por la DAU de 12.01 horas a 9.67 horas en promedio.

## REFERENCIAS

- 1.-Guízar, J. Genética clínica: Diagnóstico y manejo de las enfermedades hereditarias. 3ª ed., El manual moderno. México, (2001) p.p. 1-50, 161-163.
- 2.-Weisburger, J.H. (2001) Antimutagenesis and anticarcinogenesis, from the past to the future, *Mutat. Res.* 480-481: 23-35.
- 3.-Weisburger, J.H., Williams, G.M. (2000) The distinction between genotoxic and epigenetic carcinogens and implication for cancer risk, *Toxicol. Sci.* 57: 4-5.
- 4.-Ramel, C., Alekperov, V., Ames, B.N., Kada, T., Wattenberg, L. (1986) Inhibitors of mutagenesis and their relevance to carcinogenesis. *Mutat. Res.* 168: 47-65.
- 5.-Ames, B.N. (1979) Identifying environmental chemicals causing mutations and cancer. *Sci.* 204: 587-593.
- 6.-U.S. Department of health and human services (HHS). The health benefits of smoking cessation. DHHS publication No. CDC 90-8416. Atlanta, GA: Public health service, centers for disease control, center for chronic disease prevention and health promotion, office on smoking and health, (1990).
- 7.-Willet, W. Diet and nutrition. In: *Cancer epidemiology and prevention*, Schottenfeld, D., and Fraumeni, Jr., eds. NY, Oxford university press. (1996), p.p 438-461.
- 8.-Greenwald, P., Kramer, B., Weed, D.L., *Cancer prevention and control.*, NY: Marcel dekker. (1995), p.p. 303-327.
- 9.-HHS. Physical activity and health: A report of the surgeon general. Atlanta, GA: Centers for disease control and prevention, (1996).
- 10.-Landis, S.H., Murray, T.; Bolden, S. (2000) Cancer statistics, *Can. J. Clin.* 50(1):2398-2424.
- 11.-Klaassen, C., Casarett & Doull's. *Toxicology. The basic science of poisons.* Mc Graw-Hill. USA. (2001) pp.321-350.
- 12.-Li, A., Heflich, R. *Genetic toxicology.* CRC Press Inc. USA. (1991) pp. 131-138, 187-189, 340-355.
- 13.-De Flora, S., Izzotti, A., D'Agostini, F., Balansky, R., Noonan, D., Albin, A. (2001) Multiple points of intervention in the prevention of cancer and other mutation-related diseases, *Mutat. Res.* 480-481: 9-22.

- 
- 14.-Deshpande, S.S., Deshpande, U.S., Salunke, D.K. Nutritional and health aspects of foods antioxidants, en: Food antioxidants: technological, toxicological, and health perspectives, Madhari, D.L., Deshpande, and Salunke, D.K. Marcel Dekker, Inc. USA., (1996) p.p. 361-379.
- 15.-Bergendi, L., Benes, L., Durackova, Z., Ferendik, M. (1999) Chemistry, physiology and pathology of free radicals, *Life Sci.* 65: 1865-1874.
- 16.-Freeman, A.B., Crapo, D.J. (1982) Biology of disease: free radicals and tissue injury. *Lab. Invest.* 47: 412-426.
- 17.-Halliwell, B., Gutteridge, J. Free radicals in biology and medicine. Oxford science pub. Oxford. (1998) p. 936.
- 18.-Niki, E. (2000) Free radicals in the 1900, from in vitro to in vivo, *Free Rad. Res.* 33: 693-704.
- 19.-Halliwell (1999) Antioxidant defense mechanisms: From the beginning to the end. *Free Radic. Res.* 31(4):261-72.
- 20.-Stocker, R., Frei, B., Endogenous antioxidant defences in human blood plasma, H. Sies Ed., Academic Press Limited (1991), p.p. 213-243.
- 21.-Tirillini, B. (2000) Grapefruit: the last decade acquisitions. *Fitot.* 71: S29-S37
- 22.-Álvarez, R. (2000) Efecto Inhibitorio de la naringina contra la genotoxicidad producida por la ifosfamida y el metil metanosulfonato in vivo. Tesis Maestría, ENCB, IPN, México.
- 23.-Lohman, P.H., Gentile, J.M., Gentile, G., Ferguson, L.R. (2001) Antimutagenesis/ anticarcinogenesis 2001: screening, methods and biomarkers. *Mutat. Res.* 480-481: 1-4.
- 24.-Gorinstein, S., Martín-Belloso, O., Park, Y., Haruenkit, R., Lojek, A., Ciz, M., Caspi, A., Libman, I., Trakhtenberg, S. (2001) Comparison of some biochemical characteristics of different citrus fruits. *Food Chem.* 74:309-315.
- 25.-Russo, A., Acquaviva, R., Campisi, A., Sorrenti, V., Di Giacomo, C., Virgata, G., Barcellona, M.L., Vanella, A. (2000) Bioflavonoids as antiradicals, antioxidants and DNA cleavage protectors. *Cell Biol. Toxicol.* 16: 91-98.
- 26.-Lee, I.M. (1999) Antioxidant vitamins in the prevention of cancer. *Proc. Assoc. Am. Physicians.* 111: 10-15.
- 27.-Brockman, H. E., Stack, H. F., Waters, M. D. (1992) Antimutagenicity profile of some natural substances. *Mutat. Res.* 267: 157-172.

- 
- 28.-Cerdeira, J.J., Normann, S.J., Sullivan, M.P., Burgin, C.W., Robbins, F.L., Vathada, S., Leelachaikul, P. (1994) Inhibition of atherosclerosis by dietary pectin in red wine with sustained hypercholesterolemia, *Circulation*, 89: 1247-53.
- 29.-Baekey, P.A., Cerdeira, J.J., Burgin, C.W., Robbins, F.L., Rice, R.W., Baumgartner, T.G. (1988) Grapefruit pectin inhibits hypercholesterolemia and atherosclerosis in miniature wine, *Clin. Cardiol.* 11 (9): 597-600.
- 30.-Da Silva, R.R., de Oliveira, T.T., Nagem, T.J., Pinto, A.S., Albino, L.F., de Almeida, M.R., de Moraes, G.H., Pinto, J.G. (2001) Hypocholesterolemic effect of naringin and other flavonoids, *Arch. Latinoam. Nutr.* 51: 258-264.
- 31.-Bachur, N., Gordon, S., Gee, M. (1977) Anthracycline antibiotic argmentation of microsomal electron transport and free radical formation, *Mol. Pharmacol.* 13: 901-910.
- 32.-Kalyanaraman, B., Pérez Reyes, E., Mason, R. P. (1980) Spin trapping and direct electron spin resonance investigations of the redox metabolism of quinone anticancer drugs, *Biochim. Biophys. Acta.* 630:119-130.
- 33.-Kalyanaraman, B., Sealy, R. C., Sinha, B. K. (1984) An electron resonance study of the reduction of peroxides by anthracycline semiquinones, *Biochim. Biophys. Acta.* 799:270-289.
- 34.-Goodman, G.A., Rall, W.T. *Las bases farmacológicas de la terapéutica*, Editorial Panamericana, México p.p. (1998) 1171-1222.
- 35.-Aubel Sadron, G., Londos Gagliardi, D. (1984) Daunorubicin and doxorubicin, anthracycline antibiotics, a physicochemical and biological review, *Biochimic.* 66:333-352.
- 36.-Sinha, B., Trush, M., Kennedy, K., Mimnaugh, E. (1984) Enzymatic activation and binding of adriamycin to nuclear DNA, *Cancer Res.* 44: 2892-2896.
- 37.-Whang Peng, J., Leventhal, G. B., Adarnson, W. J., Perry, S. (1969) The effect of daunomycin on human cells in vivo and in vitro, *Cancer.* 23, 113-121.
- 38.-Buja, M., Ferrans, V., Mayer, R., Roberts, W., Henderson, E. (1973) Cardiac ultrastructural changes induced by daunorubicin therapy, *Cancer.* 32: 771-788.
- 39.-Keizer, H., Pinedo, H., Schuurhuis, G., Joenje, H. (1990) Doxorubicin (adriamycin): A critical review of free radical-dependent mechanisms of cytotoxicity, *Pharmac. Ther.* 47:219-231.
- 40.-Kostoryz, L., E., Yourtee, M. D. (2001) Oxidative mutagenesis of doxorubicin Fe(III) complex, *Mutat. Res.* 490:131-139.

- 
- 41.-Wolff, S. Sister chromatid exchanges: the most sensitive mamalian system for determining the effects of mutagenic carcinogens. en: Berg K. Genetic damage in man caused by environmental agents. Academic Press, N.Y., USA (1979), p.p. 229-246.
- 42.-Tice, R.R. (1989). A review of The international symposium on sister chromatid exchanges: Twenty five years of experimental research. *Environ. Mut.* 6: 737-752.
- 43.-Goto, K. (1979) Simple differential giemsa stainin of sister chromatids after treatment with photosensitive dyes an exposuse to lighth and the machanism of staining, *Chromosome* 53: 223-230.
- 44.-Meschini, R., Bastianelli, R., Palitti, F. (1996) The diplochromosome of endoreduplicated cells: a new approach to highlight the mechanism of sister chromatid exchange. *Chromosome*. 105: 50-54.
- 45.-Pastink, A., Eken, J., Lohman, P. (2001) Genomic integrity andrepair of double strand DNA breaks. *Mutat. Res.* 480-481: 37-50.
- 46.-Tice, R., Hollander, A.. (1989) A review of the international simposium on sister chromatid exchanges: twenty five years of experimental research. *Environ. Mut.* 6:737-752.
- 47.-Painter, R.B. (1980) A replication model for sister chrmadid exchange. *Mutat. Res.* 70:337-341.
- 48.-Dronkert, M., Beverloo, B., Johnson, R. (2000) Mouse RAD54 affects DNA doble-strand break repair and sister chromatid exchange. *Mol Cell. Biol.* 20: 3147-3156.
- 49.-De Flora, S., Izzoti, A., Randerath, K. (1996) DNA adducts and chronic degenerative diseases. Pathogenetic relevance and implications in preventive medicine. *Mutat. Res.* 336: 197-238.
- 50.-Ames, B.N., Shigenaga, M.K., Hagen, T.M. (1993) Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90: 7915-7919.
- 51.-Halliwell, B., Auroma, O. (1991) DNA damage by oxigen-derived species, *FEBS*. 281: 9-19.
- 52.-Edenharder, R., Worf-Wandelburg, A., Decker, M., Platt, L. (1999) Antimutagenic effects and possible mechanisms of action of vitamins and related compounds against genotoxic heterocyclic amines from cooked food. *Mutat. Res.* 444: 235-248.
- 53.-Fenech, M. (2001) Recommended dietary allowances (RDAs) for genomic stability. *Mutat. Res.* 480-481: 51-54.
- 54.-Richelle, M., Tavazzi, I., Offord, E. (2001) Comparison of the antioxidant activity of commonly consumed polyphenolic beverages (coffee, cocoa and tea) prepared per cup serving. *J. Agrc. Food Chern.* 49: 3438-3442.

- 
- 55.-Madrigal, E., Díaz, S. (1998). In vivo and in vitro antigenotoxic nordihydroguaiaretic acid against SCEs induced by methyl methanesulfonate. *Mutat. Res.* 419: 163-168.
- 56.-Madrigal E., Velazquez N., Díaz, S. (1997) Inhibitory effect of chlorophyllin on the frequency of sister chromatid exchanges produced by benzo[a]pyrene in vivo. *Mutat. Res.* 388: 79-83.
- 57.-Henández, A. (2003) Antigenotoxicidad del aceite esencial de *Matricaria chamomilla* evaluada en células somáticas y germinales de ratón, Tesis Doctoral, ENCB, IPN, México.
- 58.-Anderson R., Fisher L., Hara Y., Harris T. (2001) Green tea catechins partially protect DNA from OH radical induced strands breaks and base damage through fast chemical repair of DNA radicals. *Carcinogen.* 22: 1189-1193.
- 59.-Clayocombe, K., Meydani, S. (2001) Vitamin E and genome stability. *Mutat. Res.* 475: 37-44.
- 60.-Halliwell, B. (1994) Vitamin C: The key to health or a slow acting carcinogen. *Redox. Rep.* 1: 5-9.
- 61.-Rivas G., Díaz, S., Madrigal, E. (1992) Inhibition of mitomycin C induced sister chromatid exchanges by vitamin C in vivo. *J. Toxicol. Environ. Health.* 35: 107-113.
- 62.-Martino, L. (2003). Efecto antigenotóxico de la naringina contra el daño ocasionado por la daunorrubicina in vivo. Tesis profesional, ULSA, México.
- 63.-Cariño, R., (2002). Evaluación de la actividad antioxidante de la naringina y de su capacidad antioxidante contra el daño producido por la daunorrubicina. Tesis de maestría, ENCB, IPN, México.
- 64.-Sanchez, G., (2003). Efecto genoprotector del jugo de toronja sobre el daño producido por la ifosfamida in vivo. Tesis profesional. ENCB, IPN, México.
- 65.-Francisco, C. (2003). Efecto antigenotóxico y anticitotóxico del jugo de toronja in vivo contra el daño producido por el metil-metanosulfonato. Tesis profesional, ENCB, IPN, México.
- 66.-Hortobágyi, N. (1997) Anthracyclines in the treatment of cancer. *Drugs* 54: 1-7.
- 67.-Dargel, R. (1992) Lipid peroxidation a common pathogenetic mechanism. *Exp. Toxic. Pathol.* 44: 169-181.
- 68.-Laurent, G., Jaffrézou, J. (2001) Signaling pathways activated by daunorubicin. *Blood.* 98: 913-924.

- 
- 69.-Galloway, M., Painter, R. (1979) Vitamin C is positive in the DNA synthesis inhibition and sister chromatid exchange tests. *Mutat. Res.* 60: 321-327.
- 70.-Speit, G., Wolf, M., Vogel, W. (1980) The SCE inducing capacity of vitamin C: investigation in vitro and in vivo. *Mutat. Res.* 78: 273-278.
- 71.-Ferguson, L. (2001) Role of plant polyphenols in genomic stability. *Mutat. Res.* 475: 89- 111.
- 72.-Kong, T., Rong, Y., Hebbar, V., Chen, C., Owour, E., Hu, R., Mandkekar, S. (2001) Signal transduction events elicited by cancer prevention compounds. *Mutat. Res.* 480-481: 231-241.
- 73.-Davis, W., Lamson, S., Matthew, S., Brignall, D. (1999) Antioxidants in cancer therapy, their actions and interactions with oncologic therapies. *Altern Med Rev*: 4(5):304-329.
- 74.-Jaya, B., Vaidyanathan, T., (2002). Glucuronidation and sulfation of the tea flavonoid epicatechin by the human and rat enzymes, *Drug met. Disp.* 30: 8, 897-903.
- 75.-Sharma, N., Trikha, P., Atar, M., Raisuddin, S. (2001) Inhibition of benzo[a]pyrene and cyclophosphamide induced mutagenicity by *Cinnamomum cassia*. *Mutat. Res.* 480-481: 97-108.
- 76.-De Flora, S. (1998) Mechanisms of inhibitors of mutagenesis and carcinogenesis. *Mutat. Res.* 402: 151-158.
- 77.-Diaz, S., Madrigal, E., Marquez, P. (1999) Inhibitory effect of nordihydroguaiaretic acid on the frequency of micronuclei induced by methyl methanesulfonate in vivo. *Mutat. Res.* 441: 53-58.
- 78.-Denizot, F., Lang, R. (1986) Rapid colorimetric assay for cell growth and survival modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *J. of Immunological Methods*, 89 271-277.