



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLÁN**

**Inducción de Intercambios de
Cromátidas Hermanas y modificación de
la cinética de proliferación celular
provocada por el extracto hexánico de
cuachalalate en cultivo de linfocitos
humanos.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

P R E S E N T A :

MARITZA QUINTANAR TALONIA

ASESORA.:

DRA. SANDRA DÍAZ BARRIGA ARCEO

Cuautitlán Izcalli Edo. de México 2005



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.

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo receptival.

NOMBRE: Maritza Quintanar Talonio

FECHA: 14/ Septiembre/ 2005

FIRMA: Quintanar



GOBIERNO NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

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

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN



DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES

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

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

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la TESIS:

Inducción de intercambios de cromátidas hermanas y
modificación de la cinética de proliferación celular
provocada por el extracto hexánico de cuachalaliate
en cultivo de linfocitos humanos.
que presenta la pasante: Maritza Quintanar Talonia
con número de cuenta: 40001497-9 para obtener el título de:
Química Farmacéutica Bióloga

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

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 23 de agosto de 2005

| | | |
|------------------|--------------------------------------|--|
| PRESIDENTE | <u>Dra. Gilda Flores Rosales</u> | |
| VOCAL | <u>QFB. Juan Chiu Chan</u> | |
| SECRETARIO | <u>Dra. Sandra Díaz Barriga Arce</u> | |
| PRIMER SUPLENTE | <u>MC. Marina L. Morales Galicia</u> | |
| SEGUNDO SUPLENTE | <u>QFB. Rosalba Bonilla Sánchez</u> | |

AGRADECIMIENTOS.

A Dios por permitirme lograr una meta más en mi vida.

Gracias Señor

Gracias Señor...

Porque en la cruel tormenta, me haces escuchar el suave susurro de tu voz.

Gracias Señor...

Pues envías rayos de luz que iluminan mi camino en medio de las adversidades.

Gracias Señor...

Por cada instante y cada problema que me recuerda mi necesidad de Ti.

Gracias Señor...

Porque hasta en lo alto del cielo y en la profundidad del océano Tus oídos están siempre atentos a escuchar mi clamor.

Gracias Señor...

Porque a pesar de los errores de la gente, Sigues enviando sol y lluvia sobre todos sin distinción.

Gracias Señor...

Por este día, en el que me das la oportunidad de Buscarte nuevamente

Gracias Señor...

Por cada ser humano que se cruza en mi camino, pues algo deseas que aprenda de él.

Por todo esto y lo que me sería imposible de contabilizar...

!!!Gracias Señor!!!

A la Universidad Nacional Autónoma de México, por forjar grandes profesionistas.

A mis grandes amigos Alma e Israel, por su apoyo, por escucharme cuando lo necesito, por que siempre podrán contar conmigo y siempre podré contar con ellos.

A la Dra. Sandra por su paciencia y amistad.

A la QFB. Rosalba Bonilla, por su amistad y la revisión de ésta tesis.

A la Dra. Gilda Flores Rosales por su paciencia y consejos para la mejora de ésta tesis.

A QFB. Juan Chiu Chan y MC. Marina L. Morales Galicia por la revisión de la presente tesis.

Al laboratorio de Química Medicinal a cargo del Doctor Enrique Ángeles Anguiano por su apoyo en la realización de ésta tesis.

A Sara, Mariterez y Laura por su ayuda, amistad y confianza.

Al Sr. Pablo por su ayuda.

A todos mis amigos que en algún momento me han apoyado; por hacer mi estancia en la universidad más grata Honny, Julio, Uriel y Luis Martín.

A mi tía Estela, por albergarme en su casa durante toda mi carrera profesional.
GRACIAS

DEDICATORIAS

A mis papás, Toño y Maru, por que sin ellos yo estaría perdida....

Gracias papá por tu trabajo, por guiar a nuestra familia, por que me has enseñado que con trabajo y esfuerzo todo se puede lograr. Papá hoy quiero que sientas este logro como tuyo.

Gracias mamá por tus grandes esfuerzos, por ser siempre una mujer luchadora, por que nunca te has rendido ante las adversidades y por ser la mejor mujer del mundo. Gracias.

A mis hermanos Mayda, Maribel y Julio Antonio, por todos los momentos que hemos compartido, por el apoyo incondicional que siempre me han brindado y por lo que aún nos falta.

Índice

| | |
|--|----------|
| Lista de abreviaturas | i |
| Lista de figuras | ii |
| Lista de tablas | iii |
| Resumen | iv |
| Capítulo I Generalidades | |
| 1. Ciclo celular | 1 |
| Etapas del ciclo celular | 1 |
| Regulación del ciclo celular | 5 |
| Ciclinas | 7 |
| Proteínas cinasas dependientes de ciclinas | 7 |
| Puntos de control | 7 |
| 2. Ciclo celular y cáncer | 8 |
| Genes supresores de tumores | 9 |
| Proteína retinoblastoma (pRb) | 9 |
| El gen p53 | 9 |
| Apoptosis | 10 |
| Fármacos antitumorales | 12 |
| Clasificación de los antineoplásicos | 12 |
| Epigenética | 15 |

| | |
|---|-----------|
| Metilación y cáncer | 16 |
| 3. Genotoxicidad | 19 |
| Clasificación de los agentes genotóxicos | 20 |
| Sistemas de prueba | 21 |
| 4. Intercambios de Cromátidas Hermanas | 23 |
| Antecedentes y definición | 23 |
| Teorías sobre la formación de ICH | 25 |
| Ventajas de la técnica | 27 |
| Cinética de proliferación celular | 28 |
| índice mitótico | 28 |
| 5. Viabilidad celular | 28 |
| Ensayo de exclusión por azul de tripano | 29 |
| 6. Cuachalalate | 30 |
| Descripción | 30 |
| Reproducción | 32 |
| Hábitat | 32 |
| Distribución geográfica | 32 |
| Manejo | 32 |

| | | |
|--------------------------------|--|----|
| | Comercialización | 32 |
| | Usos | 33 |
| | Estudios fitoquímicos | 34 |
| | Estudios farmacológicos | 37 |
| | Estudios genotóxicos | 38 |
| | Ácidos anacárdicos | 38 |
| Capítulo II Hipótesis y | | |
| objetivos | | |
| | Hipótesis | 41 |
| | Objetivos | 41 |
| Capítulo III Material y | | |
| métodos | | |
| | Material biológico | 42 |
| | Material de cristalería | 42 |
| | Material diverso | 42 |
| | Material químico | 43 |
| | Métodos | 45 |
| | Obtención del extracto hexánico e identificación | 47 |

| | | |
|----------------------------------|--|----|
| | Intercambio de cromátidas hermanas | 47 |
| | Determinación de la viabilidad celular | 50 |
| Capítulo IV Resultados | Resultados | 51 |
| Capítulo V Discusión | | 56 |
| Capítulo VI Conclusiones | | 60 |
| Capítulo VII Bibliografía | | 61 |

Lista de abreviaturas

| | |
|------|---|
| A | Adenina |
| DNA | Ácido desoxirribonucleico |
| brdU | Bromodesoxiuridina |
| C | Citosina |
| CDK | Cinasas dependientes de ciclinas |
| CMPH | Células mononucleares periféricas humanas |
| CPC | Cinética de proliferación celular |
| CTPB | Amida derivada del ácido anacárdico |
| DMSO | Dimetilsulfóxido |
| dNTP | Dinucleótido trifosfato |
| EH | Extracto hexánico |
| G | Guanina |
| HAT | Histonas acetil transferasas |
| ICH | Intercambios de cromátidas hermanas |
| IM | Índice mitótico |
| IR | Índice de replicación |
| M | Mitosis |
| MPF | Factor promotor de la maduración |
| msnm | Metros sobre el nivel del mar |
| PALA | N-fosfonoacetil-L aspartato |
| S | Síntesis |
| T | Timina |
| TMP | Timidin monofosfato |

Lista de figuras

| | | |
|-----------|---|----|
| FIGURA 1 | Ciclo celular | 3 |
| FIGURA 2 | Expresión de ciclinas en el ciclo celular | 7 |
| FIGURA 3 | Lugar de acción de los principales antineoplásicos en el ciclo celular | 13 |
| FIGURA 4 | Mecanismos moleculares de los antineoplásicos | 14 |
| FIGURA 5 | Metilación del DNA | 18 |
| FIGURA 6 | Posibles consecuencias de las mutaciones | 21 |
| FIGURA 7 | Intercambios de Cromátidas Hermanas | 24 |
| FIGURA 8 | Modelo de la formación de ICH | 26 |
| FIGURA 9 | Árbol, corteza y fruto del cuachalalate | 31 |
| FIGURA 10 | Estructuras de los compuestos de <i>Amphipterygium adstringens</i> | 36 |
| FIGURA 11 | Diagrama de flujo para la obtención de ICH | 45 |
| FIGURA 12 | Diagrama de flujo para analizar viabilidad celular | 46 |
| FIGURA 13 | Frecuencia de ICH inducidos por el extracto hexánico de cuachalalate | 52 |
| FIGURA 14 | Correlación lineal de la frecuencia de ICH en un donador de género masculino | 53 |
| FIGURA 15 | Correlación lineal de la frecuencia de ICH en un donador de género femenino | 53 |
| FIGURA 16 | Relación entre las concentraciones de cuachalalate y el índice de replicación | 54 |
| FIGURA 17 | Correlación lineal entre la concentración del extracto hexánico de cuachalalate y la viabilidad celular | 55 |

Lista de tablas

| | | |
|---------|---|----|
| TABLA 1 | Ciclinas y CDK involucradas en la regulación del ciclo celular | 5 |
| TABLA 2 | Usos del Cuachalalate | 33 |
| TABLA 3 | Acumulación de los componentes presentes en <i>A. adstringens</i> respecto al sexo de la planta | 35 |
| TABLA 4 | Acumulación de compuestos presentes en <i>A. adstringens</i> en relación a la época de recolección | 35 |
| TABLA 5 | Frecuencias de ICH por metafase en cultivo de linfocitos | 52 |
| TABLA 6 | Índice de replicación, índice mitótico y cinética de proliferación celular en cultivo de linfocitos sometidos a diferentes concentraciones de extracto hexánico de cuachalalate | 54 |
| TABLA 7 | Viabilidad celular después de la exposición a diferentes concentraciones de extracto hexánico de cuachalalate | 55 |

Resumen

El Cuachalalate (*Amphipterygium adstringens*) es una planta utilizada para el tratamiento de diversas enfermedades en la medicina tradicional mexicana, por ejemplo, cáncer del tracto gastrointestinal, colelitiasis, hipercolesterolemia, úlceras gástricas, varias enfermedades inflamatorias, entre otras. El objetivo de este trabajo es evaluar *in vitro* el potencial genotóxico inducido por el extracto hexánico de la corteza de cuachalalate, el cual fue ensayado a diferentes concentraciones (233, 466, 698 y 931 ng/mL) por adición del extracto a cultivos de linfocitos humanos obtenidos de sangre periférica de dos donadores de diferente género. A las 24 horas de incubación se adicionó un análogo de base, la 5-bromodesoxiuridina, a una concentración final de 5µg/mL y las diferentes concentraciones del extracto de cuachalalate. La obtención de las metafases se llevó a cabo de acuerdo a los métodos convencionales. Una vez obtenidas las preparaciones se realizó la tinción diferencial. Los puntos evaluados fueron intercambios de cromátidas hermanas (ICH), índice de replicación (IR), índice mitótico (IM) y viabilidad celular. El análisis estadístico se realizó utilizando un análisis de varianza ANOVA y Tukey-Kramer. El análisis revela que el extracto hexánico de cuachalalate a las dosis ensayadas no incrementa la frecuencia de ICH. El IR y viabilidad celular fueron estadísticamente no significativas, mientras que el IM disminuye a las concentraciones de 698 y 931 ng/mL. Estos resultados indican que el extracto hexánico no induce daño genotóxico o citotóxico a las concentraciones probadas.

Capítulo I. Generalidades

1. Ciclo celular

El ciclo celular puede ser considerado como el ciclo vital de una célula individual, los acontecimientos principales son la síntesis de DNA y la división celular. La síntesis de DNA en células eucariotas se efectúa en un momento muy preciso, mientras que en las bacterias esta síntesis es casi continua.

Muchas veces se piensa que ciclo y división celular son términos intercambiables, en sentido estricto no lo son. El ciclo celular es el conjunto de procesos que ocurren ordenadamente y por medio de los cuales una célula crece y se divide, dando lugar a dos células hijas, mientras que durante la división celular, o mitosis, una célula genera dos células hijas, en una acción, que es tan sólo una de las cuatro partes del ciclo celular, la llamada fase M [López, 2002]

Etapas del ciclo celular

El ciclo celular está determinado por cuatro fases diferentes, fase S (síntesis), fase M (mitosis) y las fases llamadas G1 y G2 que anteceden a las fases de síntesis y de mitosis respectivamente. Desde el punto de vista metabólico, el ciclo celular podría definirse como una sucesión de interfase y mitosis, en la primera ocurren todos los procesos metabólicos y regulatorios necesarios para la ordenada progresión del ciclo, mientras que la mitosis da lugar a dos células hijas (Figura 1).

a) Interfase. Una célula en interfase parece estar inactiva, muestra el núcleo y el citoplasma bien definido, sin embargo, es justo durante la interfase cuando las células que se puedan dividir se preparan. Durante la interfase ocurren tres fases del ciclo celular, conocidas como G1, S y G2. El símbolo G proviene del término en inglés gap, indicando que se trata de un "periodo de laguna" (reposo o intervalo).

1. **Fase G1.** Es la fase postmitótica y presintética, por lo tanto corresponde a condiciones diploides (2n), donde cada

cromosoma está constituido por una cromátida simple. Durante G1, la célula incrementa su tamaño y en este momento se produce la síntesis de muchos elementos citoplasmáticos, como enzimas, ribosomas y organelos, iniciando los preparativos para una división o bien quedarse en un estado de quiescencia que suele denominarse fase G0.

2. **Fase S.** La síntesis de DNA tiene lugar en ésta fase, produciéndose una copia duplicada de cada cromosoma, por lo que al final de ésta fase la célula tiene una dotación diploide ($2n$), pero el material genético se encuentra duplicado ($4C$), es decir, los cromosomas hijos, cada uno con una cromátida ahora poseen dos cromátidas [Étienne, 2000]. Al principio de la fase S se sintetizan las histonas, después se replica el DNA, primero la eucromatina rica en G-C y después la rica en A-T, la heterocromatina [Paniagua, 1999].

3. **Fase G2.** Es una fase postsintética y premitótica. En esta fase tienen lugar los preparativos necesarios para la próxima mitosis, prosigue el crecimiento de la célula, son sintetizadas otras proteínas y enzimas para preparar la división celular [Tortora y Grabowski, 2002].

b) Mitosis o fase M. Durante la fase M los cromosomas replicados se segregan al interior del núcleo hijo. La división celular se compone de la división o reparto de material nuclear denominado mitosis y de la división citoplasmática o citocinesis. Consiste esencialmente en la distribución a dos células hijas de los materiales celulares en forma equitativa [Karp, 1998].

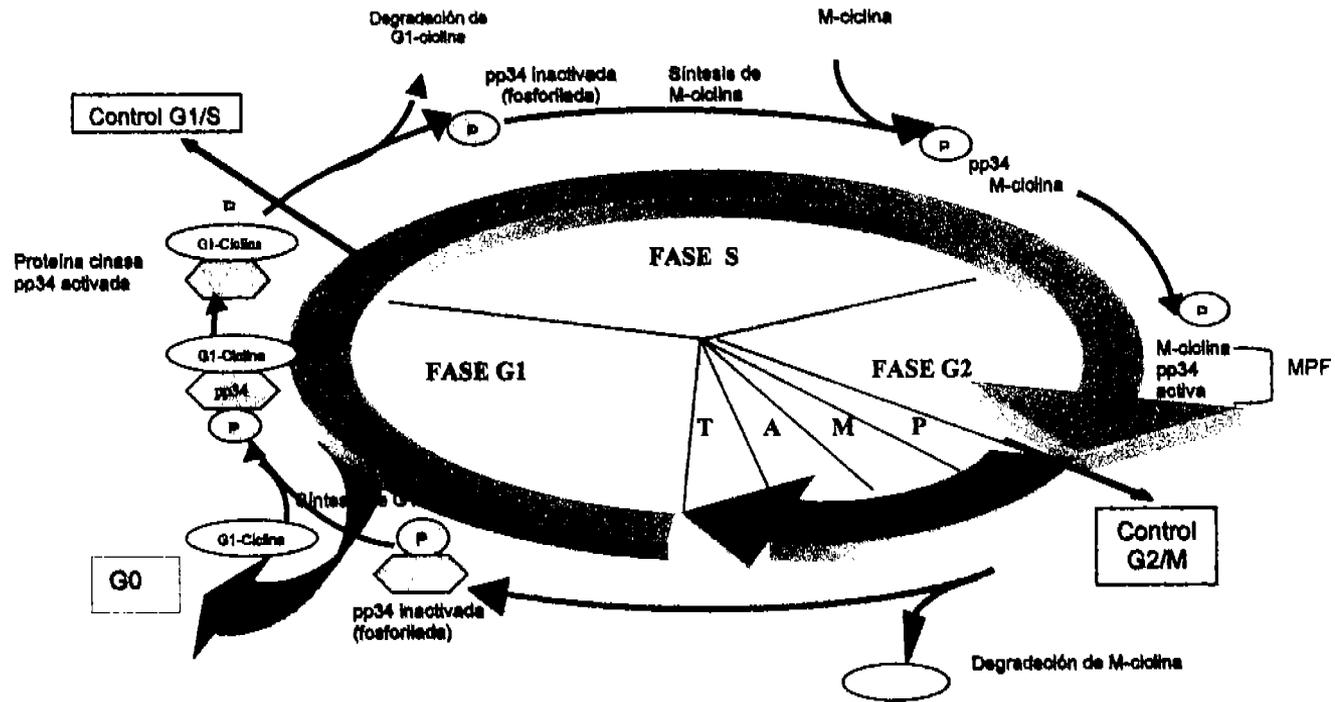


Figura 1 Ciclo celular. En esta figura se ilustran las fases del ciclo celular, interfase (fase G1, fase de síntesis o S y fase G2) y mitosis (Profase, Metafase, Anafase y Telofase). También se observan algunos de los factores que regulan la progresión de las células eucarióticas. [Tortora y Grabowski, 2002; Gardner y col., 2003] \textcircled{P} representa un grupo fosfato en la proteína pp34 que produce el estado inactivo.

Existen algunas células llamadas quiescentes, como las células nerviosas, que no se dividen y permanecen en estado de reposo llamado G₀, realizan reacciones metabólicas pero no se dividen. Otros tipos celulares, como los glóbulos blancos, pueden ser reclutados para volver de la fase G₀ y entrar nuevamente al ciclo celular [Klug y Cummings, 1999].

Sobre la base de la frecuencia de la división celular, los distintos tejidos o poblaciones celulares se pueden clasificar en poblaciones estáticas, poblaciones estables y poblaciones renovables.

Las *poblaciones estáticas* se componen de células que sufren división sólo durante el desarrollo embrionario, puesto que no se vuelven a dividir, se dice que han sufrido diferenciación terminal, se encuentran entonces en la denominada fase G₀ del ciclo celular. Las *poblaciones estables* se componen de células que rara vez se dividen y que también se encuentran en la fase G₀. Estas células no presentan diferenciación terminal dado que se pueden activar en respuesta a estímulos externos, por ejemplo, distintas formas de lesión celular, tras la cual regresan a la fase G₁ del ciclo celular y sufren división normal. Son ejemplos de este tipo de poblaciones los fibroblastos y las células endoteliales. Las *poblaciones celulares renovables* representan tejidos en los que se produce renovación constante y actividad mitótica regular, un ejemplo típico lo constituye la epidermis y el epitelio del intestino [Finn, 2000].

La célula se encuentra la mayor parte del ciclo celular en interfase, ya que la mitosis se produce rápidamente, normalmente en menos de una hora. La duración total de un ciclo en mamífero es, aproximadamente, de 10 a 30 horas. Sin embargo puede variar ampliamente entre células en el ciclo biológico de un organismo y entre tipos celulares diferentes del mismo organismo [Mojica y Ramos, 2001].

La fase G1 tiene gran interés en el estudio de la proliferación celular y de su control. En un momento tardío de G1, todas las células siguen uno de estos dos caminos: o bien abandonan el ciclo y entran en una fase de reposo, G0, o bien son obligadas a iniciar la síntesis de DNA y completar el ciclo (Figura 1). El momento en que se toma esta decisión se denomina punto de control G1 [Klug y Cummings, 1999].

Regulación del ciclo celular

Gracias a Leland H. Hartwell, Paul M. Nurse y R. Timothy Hunt, podemos explicar el ciclo celular con base a procesos moleculares y genéticos; los dos primeros descubrieron genes involucrados en la regulación del ciclo celular y el último descubrió un importante mecanismo de regulación de CDK.

En el control del ciclo celular existen dos clases de proteínas que desempeñan un papel muy importante (Tabla 1). Una clase es un grupo de enzimas llamadas *proteíncinasas*, que fosforilan selectivamente proteínas diana. El segundo grupo de proteínas se les denomina *ciclinas*, implicadas en el control de la continuación del ciclo celular, se sintetizan constantemente durante la interfase y después son degradadas bruscamente por enzimas proteolíticas al final de cada mitosis (Figura 2) [Étienne, 2000; Klug y Cummings, 1999].

Tabla 1. Ciclinas y CDK involucradas en la progresión del ciclo celular

| <i>Ciclina</i> | <i>Cinasa</i> | <i>Función</i> |
|-----------------------|----------------------|---|
| D | CDK4, CDK6 | Progresión tras el punto de restricción en el límite G1/S |
| E, A | CDK2 | Iniciación de la síntesis de DNA al comienzo de la fase S |
| B | CDK1 | Transición de G2 a M |

Tomada de Manson, Jones y Morris, 2003.

Ciclinas

Las ciclinas controlan el ciclo celular mediante la regulación de las cinasas dependientes de ciclinas. Existen numerosas ciclinas, las principales en humanos son las ciclinas A, B, D y E. Algunas de las cuales constituyen familias, por ejemplo las ciclinas B1 y B2, o las D1, D2, D3 y D4.

- a) *Ciclinas de la fase G1 o ciclinas de inicio.* Son aquellas que intervienen regulando el punto de control G1/S. En humanos pertenecen a este grupo las ciclinas del tipo D y la ciclina E. Tienen una vida media muy corta (Figura 2).
- b) *Ciclinas mitóticas o de la fase G2.* Este grupo está formado por las ciclinas A, B1 y B2, regulan el punto de control G2/M. La ciclina A participa en el control de la replicación del DNA y en la entrada a mitosis; la ciclina B, solo participa en la mitosis [Luque y Herráez, 2001].

La ciclina A, cuya función es necesaria en la transición hacia la mitosis, es también una proteína importante en la fase S, la síntesis de esta ciclina en G1 tardía es esencial para la entrada de las células hacia la fase S [Girard y Col., 1991].

La ciclina D parece ser la responsable de establecer la decisión de entrar al ciclo celular, actuando como sensor de factores de crecimiento y su expresión depende más de factores extracelulares que el estadio de la célula en el ciclo celular [Sherr, 1994].

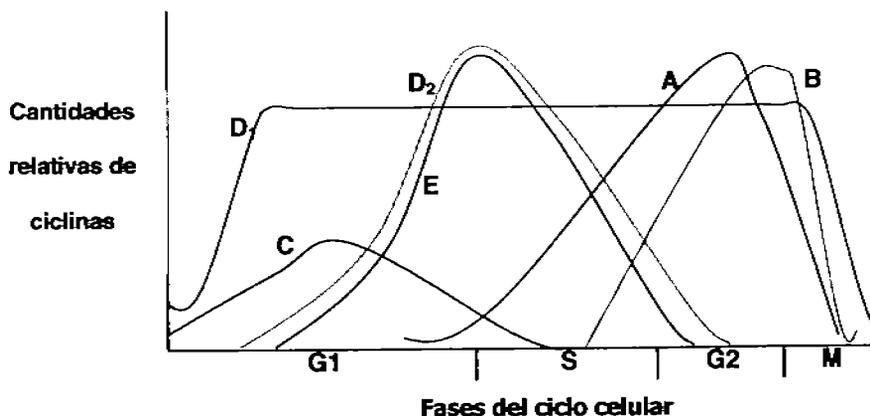


Figura 2. Expresión relativa de los momentos y de las cantidades de ciclinas durante el ciclo celular [Klug y Cummings, 1999].

Proteínas cinasas dependientes de ciclinas

Constituyen una familia de proteínas con gran homología de secuencia (superior al 50%) que fosforilan residuos de serina y treonina de proteínas sustrato específicas. Se trata por lo tanto de serina/treonina cinasas.

Sin embargo, las CDK (cinasas dependientes de las ciclinas), como su nombre lo indica, sólo son activas cuando se unen y forman un complejo con las ciclinas formando heterodímeros que se componen de una unidad reguladora llamada ciclina y, su contraparte catalítica, las CDK. Las CDK activadas estimulan la progresión del ciclo celular fosforilando proteínas específicas de la célula, necesarias para el paso al siguiente estadio, son consideradas reguladores positivos del ciclo [Richardson y Le, 2002].

Puntos de control

En el ciclo celular existen dos puntos de control cruciales: la transición de G1 a S y la transición de G2 a M (Figura 1).

1) En la transición G1 – S existe un punto denominado punto sin retorno o punto de restricción (punto R), se llama inicio en levaduras de gemación. Ocurre

cerca del final de G1 ($2n$, 2C); en este punto la célula entra de manera irreversible en la fase S de síntesis de DNA. El paso por este punto lo regulan las ciclinas G1.

2) Transición G2– M, ocurre al final de G2 ($2n$, 4C). Si la célula no supera este punto, permanece con un complemento doble de dotación cromosómica. Este punto de control es llamado "punto T" (transición). Se ha considerado controlado por un factor promotor de la maduración (MPF). Este factor consiste también en el ensamblaje de un grupo de ciclinas, denominadas ciclinas mitóticas con moléculas CDK, la activación de ambas proteínas conduce a una secuencia de fosforilaciones que inicia la entrada a mitosis (Figura 1). Este punto está controlado por la ciclina B [Paniagua, 2002].

Además de las ciclinas, el ciclo celular está influido por otros factores entre los que podemos encontrar factores de crecimiento, hormonas e interacciones intercelulares.

La repetición ordenada y controlada del ciclo celular define su duración característica, es decir determina el grado de proliferación normal de las células en cada tejido. Cuando la producción celular es continua, excesiva y descontrolada se origina el cáncer.

2. Ciclo celular y cáncer

El cáncer se caracteriza por un crecimiento celular incontrolado y por la capacidad de extenderse o producir metástasis desde su localización original a otras localizaciones corporales. Las células cancerosas pierden el control sobre el ciclo celular y proliferan rápidamente.

El cáncer representa la expansión clonal de una célula en la que se ha producido suficiente cambio de DNA genómico como para transformar el fenotipo de la célula [Gardner, 2003].

Actualmente se acepta que el cáncer es una enfermedad genética, resultado del cúmulo de alteraciones en un conjunto de genes que pertenecen a dos grandes grupos, los oncogenes y los genes supresores de tumores, cuyos productos ejercen funciones básicas para el buen funcionamiento, crecimiento y muerte de todas nuestras células.

Genes supresores de tumores

La mitosis puede estar regulada de dos maneras, por genes que actúan normalmente deteniendo la división celular o por genes que normalmente funcionan promoviendo la división celular (protooncogenes). La primera clase son llamados genes supresores de tumores, son genes expresados en células normales, bloquean la proliferación celular y su pérdida de actividad produce un crecimiento sin inhibición. Los más estudiados en este momento son el gen retinoblastoma (*Rb*) y el *p53* [Solari, 1980; Orozco y Gariglio, 1999].

Proteína retinoblastoma (pRb)

Los productos del gen *Rb* (localizado en el brazo largo del cromosoma 13, 13q14) bloquean la proliferación celular mediante el secuestro de proteínas reguladoras de genes, actúan en la fase G1 inhibiendo el paso a la fase S y pudiendo producir el estado G0 [Paniagua, 2002]. La hiperfosforilación de pRb ocurre siguiendo la formación de complejos CDK4-ciclina o CDK6-ciclina durante la mitad y hacia la fase final de G1. Este evento de fosforilación resulta en la liberación del factor de transcripción, E2F1, de pRb, el cual transcribe genes críticos para la progresión del ciclo celular, ejemplo, dihidrofolato reductasa, ciclina A y ciclina E [Sherr, 2000].

El Gen p53

El antioncogen p53 se localiza en el brazo corto del cromosoma 17 (17p13.1) y contiene 11 exones que codifican para 393 aminoácidos. Codifica una fosfoproteína nuclear de 53 kDa, actúa como factor de transcripción y se

encuentra abolida funcionalmente en más del 50% de los tumores malignos [Solari, 2000].

La proteína p53 llamada "guardián del genoma" participa en la respuesta celular al daño genético en dos formas: 1) deteniendo el ciclo celular en la fase G1, lo cual permite que se repare el DNA antes de la división celular y 2) participando en el inicio de apoptosis, cuando el daño genético ha sido muy importante y ya no se puede reparar [Orozco y Gariglio 1999; Vousden, 2002].

Existen algunos factores de estrés que pueden iniciar la estabilización, acumulación y activación de p53. Estos incluyen daño al DNA, decremento de los niveles de dNTP, hipoxia, pérdida de una señal de supervivencia celular, activación de oncogen, célula en crecimiento anormal y, más recientemente, quelación con hierro (Fe) [Richardson, 2002]. Una vez activado p53 puede iniciar la transcripción y subsecuente expresión de varios genes río abajo que encomiendan a la célula a diferenciación senescente, reparación del DNA, detención celular y/o apoptosis [Vousden y Woude, 2000].

Se ha observado que como resultado de diversos tratamientos genotóxicos aumenta la concentración intracelular de p53, lo cual induce detención del ciclo celular y reparación del DNA o apoptosis [Crighon y Ryan, 2004].

Apoptosis

La muerte celular está regulada, ciertas células llegan de manera ordenada a una muerte programada genéticamente, este proceso se llama apoptosis [Tortora y Grawboski, 2002].

La apoptosis es un proceso fisiológico, controlado genéticamente, que se da en todo tipo de células de organismos multicelulares y por tanto en todos los órganos y sistemas, mediante el cual sólo las células dañadas o no deseadas activan mecanismos que conducen a su propia destrucción [Luque y Herráez, 2001]. En la

necrosis, en cambio, se observan numerosas células vecinas en similares circunstancias, en estadios diferentes de desintegración, y sus causas son siempre patológicas (agentes tóxicos, traumáticos, entre otros). La principal diferencia de la necrosis, es que se trata de una muerte celular accidental, con liberación del contenido celular de la célula necrótica al tejido y la consiguiente inflamación y daño tisular.

Las características morfológicas que ocurren en una célula en apoptosis consisten en: la condensación de la cromatina, se fosforila y desensambla la lámina nuclear, posteriormente se fragmenta el núcleo, mientras que el retículo endoplásmico se dilata y forma vesículas que se fusionan con la membrana. Finalmente, la célula se rompe en varias vesículas, llamadas cuerpos apoptóticos, que contienen organelos intactos y fragmentos nucleares, los cuales son fagocitados. El contenido celular no sale al exterior, evitándose la inflamación y daño tisular. En células de cultivo este proceso puede durar en torno a 30 a 60 minutos [Jiménez y Merchant, 2003].

La apoptosis puede iniciarse en el tercio final de la fase G1 de la mitosis para evitar que una célula dañada pase a la fase de síntesis, y en la fase G2 para evitar que algunas células aún inmaduras entren en mitosis; de hecho en esta fase G2 existen elementos de detección de inmadurez celular que inducen la apoptosis cuando la célula no está capacitada para entrar en mitosis. El resultado final es que durante el ciclo celular se determina cuándo la célula debe entrar en el proceso de autodestrucción o continuar el ciclo y dividirse, lo que en la práctica supone un equilibrio entre mitosis y apoptosis, regulando la población celular de cada tejido.

Fármacos antitumorales

Los fármacos denominados antitumorales o antineoplásicos son capaces de interferir en el proceso de desarrollo de ciertos tumores malignos (cáncer) y por lo tanto combatirlos [Kuklinsk, 2000].

Muchos de los citotóxicos más potentes actúan mediante daño al DNA (ver figura 3), su toxicidad es mayor durante la fase S del ciclo celular, otros, como los alcaloides de la vinca (vinblastina y vincristina) y los taxanos, bloquean la formación del huso mitótico durante la fase M. Por lo anterior, las neoplasias en el ser humano que muestran mayor susceptibilidad a los quimioterapéuticos son los que tienen un alto porcentaje de células en la división, pero no solo eso, sino que, tejidos normales que proliferan con rapidez como son médula ósea, folículos pilosos y epitelio intestinal también pueden ser lesionados. Por otra parte las neoplasias de crecimiento lento con fracción de proliferación pequeña, como son carcinoma de colon o pulmones, frecuentemente no reaccionan ni son destruidos por citotóxicos [Goodman, 2001].

Clasificación de los antineoplásicos

Los antineoplásicos pueden clasificarse de acuerdo a la actividad que ejercen sobre la cinética celular en (Figura 3):

- 1) **Agentes fase específicos** (ciclo dependientes y fase dependientes). Son fármacos que actúan sobre una fase concreta del ciclo celular, ejemplo, los alcaloides vincristina y vinblastina, actúan en la fase M y la L-asparaginasa que actúa en la fase G1.
- 2) **Agentes ciclo específicos pero fase inespecíficos** (ciclo dependientes y fase independientes). Son fármacos que destruyen las células que están dentro del ciclo celular, independientemente de la fase en que se encuentren, ejemplo, agentes alquilantes (mostazas nitrogenadas, tiaminas y nitrosoureas), cisplatino y los antibióticos antitumorales.

3) **Agentes ciclo inespecíficos y fase inespecíficos.** Son efectivos tanto para células en fase de división como en fase de reposo, ejemplo esteroides y la bleomicina [Kuklinsk, 2000].

En general, los fármacos específicos del ciclo celular han probado ser más eficaces en las neoplasias hematológicas y otros tumores en los cuales una proporción relativamente grande de células está proliferando o se encuentran en la fracción de desarrollo. Los medicamentos no específicos del ciclo celular, mucho de los cuales se fijan al DNA y dañan a estas macromoléculas, (ver figura 4) son efectivos en tumores sólidos tanto en la fracción de bajo como de alto desarrollo [Katzung, 2002].

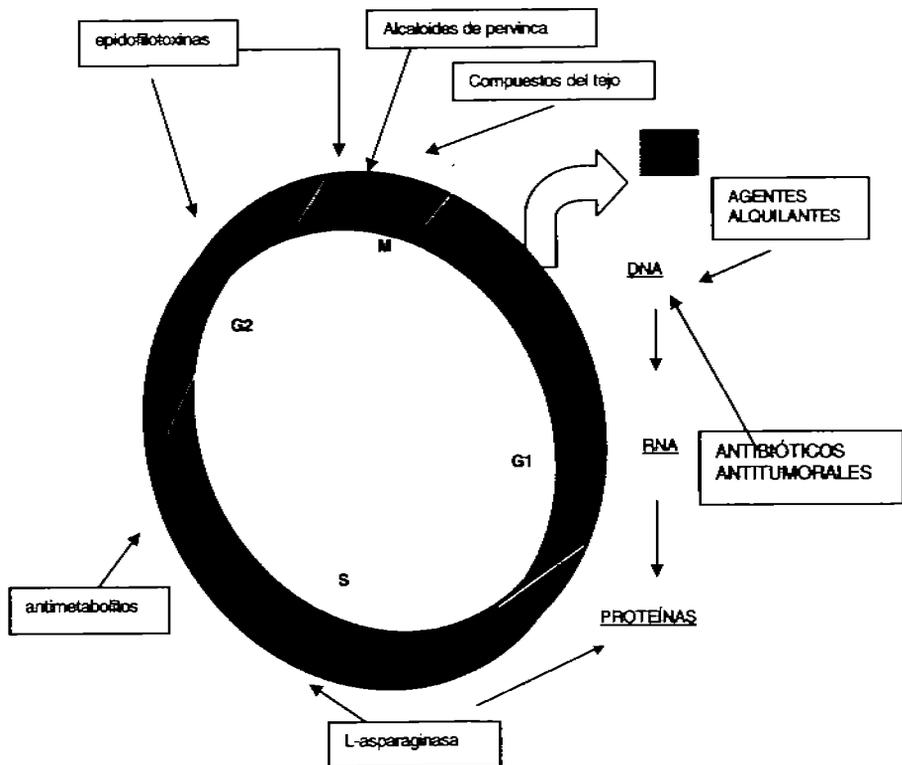


Figura 3. Lugar de acción de los principales antineoplásicos dentro de las fases del ciclo celular [Kuklinsk, 2000].

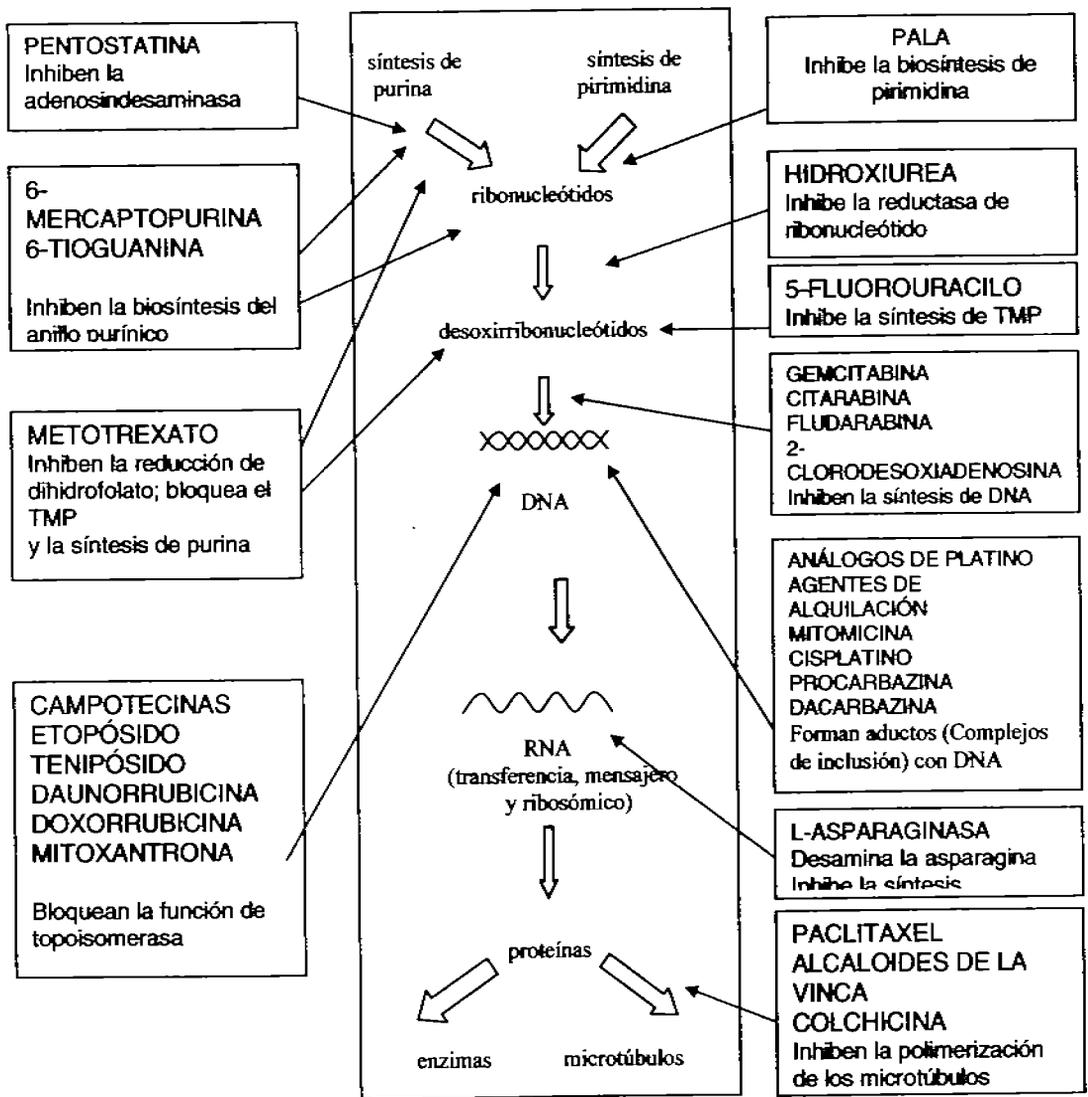


Figura 4. Mecanismos moleculares de los principales quimioterápicos útiles contra las enfermedades neoplásicas. Tomado de Goodman, 2001.

Epigenética

La epigenética se entiende como el análisis de los cambios de las funciones de los genes que son heredables y que no involucren cambios en la secuencia original de DNA, lo que significa determinar las expresiones alteradas de un mismo gen [García, R., 2003].

Waddington en 1942, definió a la epigenética como el estudio de la relación entre el genotipo y el fenotipo o como el "proceso por el cual el genotipo genera el fenotipo" [Riddihough, 2001].

Este tipo de regulación de la expresión génica, nos ayuda a explicar la diversidad morfológica y funcional de las células con un mismo genoma, lo que nos indica que no depende de la secuencia de DNA.

El control de la expresión génica depende de numerosos procesos dinámicos, así como de la estructura silente, propia del DNA, es decir, la no codificante que incluye intrones y elementos repetitivos. Concretamente se ejerce a través de la metilación y la acetilación del DNA. La presencia de metilación en el DNA humano determina cierta protección para la conservación de las secuencias y reduce la capacidad de mutación, así por ejemplo en la especie de *Drosophila melanogaster* no existe la metilación por lo que la capacidad de mutación de esta especie es sumamente elevada [Riddihough, 2001].

La metilación del DNA consiste en la incorporación de un grupo metilo en la posición cinco de la citosina (Figura 5). Esta metilación aparece casi exclusivamente en la secuencia dinucleotídica CG, que además es especialmente abundante en las regiones promotoras de los genes, dando lugar a los islotes CpG. Actualmente se conocen tres enzimas responsables de la metilación del DNA: la Dnmt1, Dnmt3a y Dnmt3b. Estas enzimas son esenciales para la vida celular y son responsables tanto de la metilación conocida como de *novo*, como de la de mantenimiento. Los genes que se transcriben activamente en ciertos tejidos

poseen islotes CpG sin metilar (o islotes hipometilados), mientras que en los tejidos donde el gen no se expresa sí están metilados. Actualmente muchas enfermedades como el retraso mental en niñas (Síndrome Rett), algunas anomalías craneofaciales, ciertas neoplasias, la inestabilidad de los centrómeros y algunas inmunodeficiencias son padecimientos potencialmente causados por cambios en la maquinaria de la metilación [Luque y Herráez, 2001; Bestor, 2000; Bird, 2002; Riddihough, 2001].

La modificación epigenética a través de la metilación tiene que ver con la represión o silenciamiento de la expresión génica. La interferencia es uno de los modelos que explican como un DNA metilado puede regular negativamente la expresión de un gen; consiste simplemente en la incapacidad por parte de un factor transcripcional de unirse al DNA en su secuencia de reconocimiento, dado que el o los grupos metilo localizados en los CpG impiden directamente dicha unión [West y col., 2002].

El segundo modelo es más complejo, en él participan un grupo de proteínas llamadas MeCP con la particularidad de unirse al DNA metilado y no requieren secuencias específicas de unión. La unión de estas proteínas al DNA metilado provoca la interacción secuencial de otras proteínas, teniendo como finalidad el inducir una estructura de cromatina altamente compacta, y por lo tanto, refractaria para la activación transcripcional [Bird, 2002].

Metilación y cáncer

Los procesos de metilación-desmetilación se han podido investigar gracias a la observación en células cancerosas de alteraciones en la metilación de DNA, posiblemente responsables de la modificación en la expresión génica característica del proceso tumoral, aunque, como ya se ha mencionado, no la única. En éstas células el DNA está globalmente hipometilado, pero al mismo tiempo algunos genes parecen estar hipermetilados (genes supresores de tumores, ver en apartados anteriores) Esta aparente contradicción es el resultado

de una elevada expresión de ambas enzimas, la metilasa y la desmetilasa (figura 5). La hipometilación provocaría la expresión de genes que habitualmente están silenciados, conduciendo posiblemente a algunos de los desajustes causantes de cáncer, mientras que la hipermetilación de los genes supresores de tumores bloquea su expresión, eliminándose su función natural, el freno de la proliferación celular, y conduciendo a la multiplicación anárquica de las células que generan el tumor [Luque y Herráez, 2001].

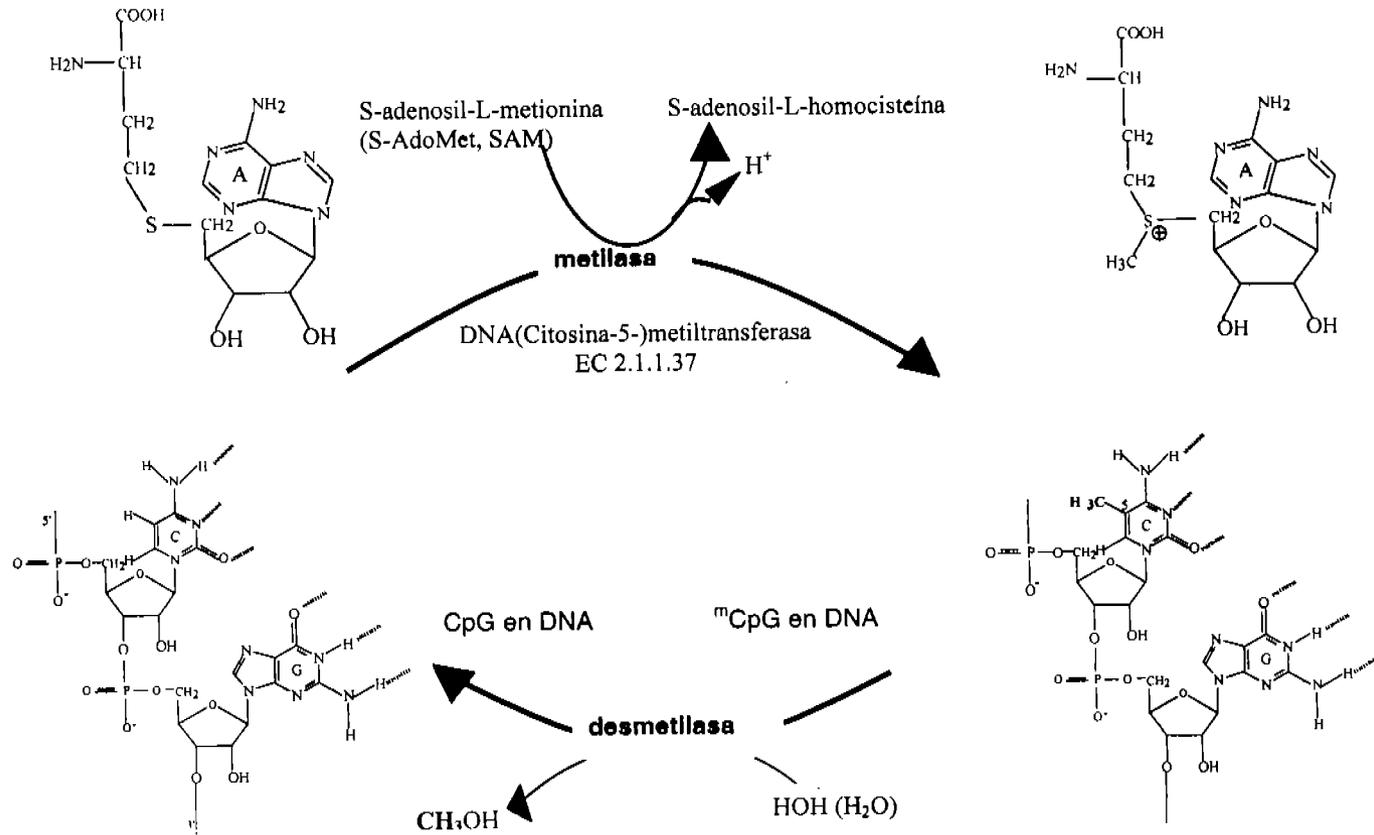


Figura 5. Metilación del DNA

3. Genotoxicidad

Todos los organismos vivos se encuentran expuestos a diversas condiciones ambientales o a la acción de agentes exógenos que les pueden provocar efectos adversos, dichas acciones son estudiadas por la toxicología. Esta ciencia se ha subdividido en varias especialidades, entre las que encontramos la toxicología genética, la cual se encarga de relacionar la acción mutagénica de diversas sustancias y sus consecuencias en la salud humana [Solari, 1980].

Se estima que existen en el mundo más de 70 000 sustancias químicas y que aparecen alrededor de 1000 nuevas anualmente. La exposición a estos compuestos, ya sea durante su formulación, producción o utilización puede tener en algunos casos efectos adversos en la salud. Estos efectos no tienen por que estar relacionados con lesiones inmediatas y aparentes, sino que pueden tardar incluso años en manifestarse [Solans y Hernández, 2005].

Algunas de estas sustancias pueden ser genéticamente activas, siendo capaces de interaccionar con el material genético (DNA). A las sustancias que pueden provocar algún tipo de modificación en la información genética se las denomina genotóxicas y pueden ocasionar efectos mutagénicos o carcinogénicos (Figura 6) [Solans y Hernández, 2005; Guizar, 1996].

Dichos agentes pueden ser reactivos y actuar directamente, o de otra manera ser biotransformados por enzimas que los hacen más electrofílicos, lo que incrementa su reactividad y por lo tanto pueden actuar indirectamente como promutágenos [Ritschel, 1983; Parke, 1969].

Clasificación de los agentes genotóxicos

Los agentes que son genotóxicos pueden clasificarse en dos categorías dependiendo de la fase del ciclo celular en la cual actúen: agentes S-dependientes y agentes S-independientes.

- a) *Los agentes S-dependientes* (radiación ultravioleta, agentes alquilantes, entre otros): inducen alteraciones de tipo cromatídico en cualquier fase del ciclo celular y las alteraciones sólo se visualizan una vez que la célula atraviesa la fase S del ciclo celular [Solans y Hernández, 2005]

- b) *Los agentes S-independientes* (radiaciones ionizantes y algunos compuestos químicos radiomiméticos como bleomicina y neocacinoestatin) inducen aberraciones de tipo cromosómico cuando actúan durante las fases G0 y G1, aberraciones de tipo cromatídico durante la fase G2 y una mezcla de ambos tipos durante la fase S del ciclo celular [Martínez y Folle, 2000].



Figura 6. Posibles consecuencias de una mutación causada por un agente mutagénico [Tomado de Bello y López 2001].

Sistemas de prueba

La gran variedad de mecanismos por los cuales los agentes físicos y químicos a los cuales estamos expuestos, inducen mutaciones, hace prácticamente imposible proponer esquemas generalizados de protección. Es por eso que los genetistas han tratado de desarrollar sistemas de prueba para detectar efectos adversos en los cromosomas.

Las características que debe tener todo sistema de prueba son básicamente la sensibilidad y la capacidad de reproducirse. La sensibilidad de un sistema de prueba se define como la capacidad del sistema para detectar con facilidad y precisión estadística un pequeño efecto mutagénico inducido. La capacidad de reproducción implica la similitud de respuesta de un sistema en y entre laboratorios [Omega-ILCE, 2005].

Los estudios para identificar el potencial genotóxico de una sustancia se pueden realizar tanto en células somáticas como en células germinales, cumpliendo con distinta función en cada tipo celular.

La EPA (Environmental Protection Agency) propone las siguientes tres categorías en la selección de sistemas de evaluación de la genotoxicidad [Brusick, 1982; Salamanca, 1990; Bello, 2001]:

1. PARA DETECTAR MUTACIONES GÉNICAS (microlesiones)
 - a) Bacterias
 - b) Levaduras
 - c) Insectos
 - d) Células somáticas de mamíferos en cultivo
 - e) Prueba del locus específico en ratón.

2. PARA DETECTAR ABERRACIONES CROMOSÓMICAS (macrolesiones)
 - a) Pruebas citogenéticas *in vivo* en mamíferos
 - b) Pruebas en insectos para detectar efectos cromosómicos hereditarios
 - c) Ensayo del dominante letal en roedores

3. PARA DETECTAR DAÑO PRIMARIO AL DNA
 - a) Reparación del DNA en bacterias
 - b) Síntesis de reparación de DNA no programada en células de mamíferos
 - c) Intercambio de cromátidas hermanas

4. Intercambios de cromátidas hermanas

Antecedentes y definición

La prueba de intercambio de cromátidas hermanas (ICH) es ampliamente utilizada en el análisis citogenético por su sensibilidad para detectar agentes que inducen daño genético. Aunque el mecanismo molecular que los produce no se ha identificado, se ha determinado una clara correlación entre la inducción de ICHs y la genotoxicidad [Gardner y col., 2003; Katto, 1977].

Los ICH son intercambios recíprocos entre cromátides de un mismo cromosoma. Estos se producen en loci homólogos, involucrando rompimiento y posterior unión durante la replicación del DNA [Latt y Shreck, 1980, Tucker 1986]. Estos cambios no alteran la polaridad, la estructura de la doble hélice del DNA ni la morfología de los cromosomas [Salamanca, 1990].

La primera en percatarse de este fenómeno fue Bárbara Mc Clintock en 1938, y más tarde en 1957, J. Herbert Taylor, Philip Woods y Walter Hughes demostraron el intercambio de cromátidas hermanas mediante la técnica de autorradiografía para detectar la cromátida hermana marcada. Estos investigadores experimentaron con puntas de raíz de haba (*Vicia faba*) y examinaron los cromosomas de estas células tras la replicación del DNA. Pudieron seguir el proceso de replicación marcando el DNA con timidina - ^3H (timidina tritiada) y autorradiografía, el resultado final del experimento es la presencia de manchas oscuras o "granos" en la superficie de la sección, identificando así el DNA recién sintetizado [Taylor, 1984].

Actualmente la identificación y el estudio de los ICH se han facilitado por las técnicas de tinción moderna. Las células se replican durante dos generaciones o más en presencia de una base análoga, 5-bromodesoxiuridina (5-BrdU), que sustituye a la timina durante la replicación celular. Se efectúa un tratamiento con el colorante Hoechst 33258, el cual no se incorpora al DNA normal, pero sí a aquel

cuyas dos cadenas han sido sustituidas por la 5-BrdU y finalmente se lleva a cabo la tinción con el colorante Giemsa [Perry y Wolf, 1974]; el resultado de dicha tinción es que una cromátida aparece teñida en oscuro y la otra en claro, facilitando la observación, en caso que existan, de segmentos intercambiados tratándose de un ICH (Figura 7).

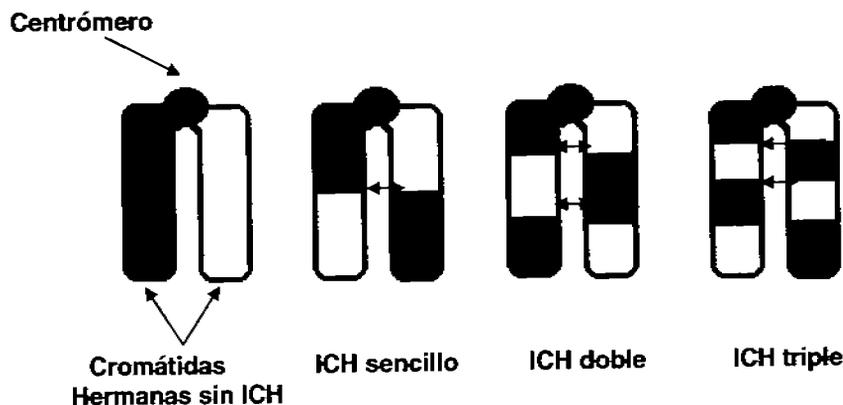


Figura 7. Representación de los intercambios entre cromátidas hermanas (ICH), en un cromosoma del tipo de los que se presentan en las células de ratón [Morales-Ramírez, 1988].

En condiciones normales, las células humanas tienen una frecuencia basal relativamente constante de ICH espontáneos por metafase, el número varía en las diferentes células, con un intervalo de 2-20, y una frecuencia promedio por metafase de 5 a 8 en sangre [Latt y col., 1977; Salamanca 1990; Verma y Babu, 1995].

Se ha descrito que factores genéticos y ambientales representan entre el 50 y 60% de la variación en la frecuencia de ICH [Hirsch y col., 1992] en menor grado, el promedio de ICH varía con la edad y el género [Pérez-Herrera y col., 1999]

Teorías sobre la formación de los ICH

Actualmente aunque no se conoce con precisión el mecanismo molecular de formación de los ICH se sabe que para que este fenómeno ocurra debe existir síntesis de DNA y que estos se producen en la horquilla de replicación o en un lugar muy cercano a ésta [Rodríguez y Morales, 2005]. Se han propuesto varias teorías para tratar de explicar su formación, así se sugirió en un principio que se originaban en los puntos de replicación que contenían una alta cantidad de guanina [Hoo y Parslow, 1979], otros autores proponen que los ICH son causados por lesiones discretas que se producen en el sitio de lesión o en un lugar próximo a él [Kato 1997, Shanfer 1997, Morales-Ramírez 1988], Painter (1980) sugiere que son lesiones múltiples las que desencadenan el proceso y por lo tanto, el sitio en que ocurren los ICH no necesariamente está asociado con la lesión en particular, sugiere que estos son una consecuencia de rearrreglos moleculares que involucran regiones del DNA mucho más largas que los sitios dañados.

Debido a sus propiedades y a la importancia que tienen en la replicación, se ha propuesto que la topoisomerasa I y la topoisomerasa II del DNA participan en la formación de los ICH [Katto, 1977; Tucker, 1993] ya que la topoisomerasa II rompe transitoriamente ambas cadenas del DNA.

De esta manera el daño condiciona una detención en la progresión de los orígenes de replicación, induciendo a una asincronía en la replicación de dichas unidades e incrementando la posibilidad de dobles rupturas, después de que una unidad ha concluido su replicación y su vecina no. Si esto ocurre, las dos cadenas, parental y su hermana de cada polo, podrían estar disponibles para unirse con la unidad de replicación adyacente aún no replicada (Figura 8).

Aunque todavía no se establece con exactitud el mecanismo de formación y el significado biológico de los ICH, su utilización como un parámetro de genotoxicidad es indudable, ya que se han observado en células de todos los organismos estudiados, lo que sugiere que son un fenómeno, o la expresión de un

fenómeno fundamental para la célula, además de que se ha comprobado que la mayor parte de los mutágenos conocidos son capaces de inducir ICH y que existe una correlación entre la frecuencia de éstos y la dosis del mutágeno [Morales-Ramírez, 1988, Takehisa y col., 1982]. Los ICH son el primer suceso visible que refleja el evento mutagénico a largo plazo, lo que la hace una prueba altamente sensible para la detección de daño cromosómico.

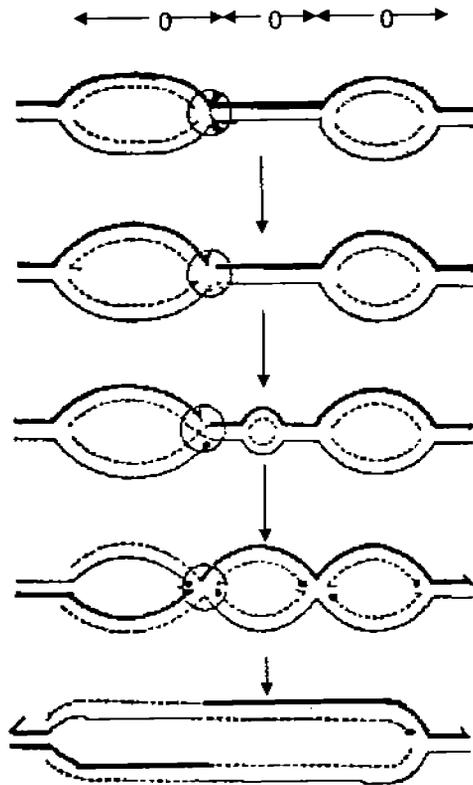


Figura 8. Modelo de la formación de ICH como unión entre replicones continuos con diferentes tiempos de replicación. Las líneas punteadas indican la cadena sintetizada y las líneas continuas indican la cadena parental de DNA. El símbolo ▼ muestra un corte en la cadena, 0 indica el origen de replicación [Tice y Hollaender, 1984]

Los agentes denominados S-dependientes, mencionados con anterioridad, son eficaces inductores de intercambios de cromátidas hermanas, la lesión que conduce al intercambio puede haber sido originada en cualquier fase del ciclo celular aunque no se manifiesta citológicamente hasta que la célula entra en división y atraviesa la fase S.

Los mejores inductores de intercambios de cromátidas hermanas son las sustancias que forman aductos covalentes con el DNA o que interfieren con su metabolismo precursor o de reparación.

Se ha observado que la frecuencia de ICH se incrementa en síndromes de inestabilidad cromosómica, como la ataxia telangiectasia y el síndrome de Bloom en los que el sistema de reparación de DNA está defectuoso, y por lo tanto, presentan un alto riesgo de desarrollar tumores malignos como el cáncer de piel [Spitz y Bondy, 1993]. Esta inestabilidad cromosómica también ha sido reportada en frecuencias más bajas en linfocitos de sangre periférica de pacientes con cáncer de mama y cáncer de ovario [Dhillon y col., 1995]. También se ha encontrado que la frecuencia de ICH se ve afectada en pacientes con carcinoma invasor [Cortés y col., 2005]. Reportes recientes indican que la frecuencia de ICH podría ser utilizada como biomarcador de cáncer [Aristel y col., 2004].

Ventajas de la técnica

Frente a determinados agentes químicos, la inducción de intercambios de cromátidas hermanas puede presentar una mayor sensibilidad que las aberraciones cromosómicas, pudiendo manifestarse efectos genotóxicos a concentraciones hasta 100 veces menores a las necesarias para producir las aberraciones cromosómicas [Solans y Hernández, 2005].

- Este estudio puede realizarse en una amplia variedad de cultivos celulares, como por ejemplo en linfocitos humanos.

- Es un método sensible y de bajo costo, para la detección de daño en el DNA cromosómico inducido por agentes genotóxicos.
- Permite una identificación inequívoca del número de fases S y por tanto de ciclos celulares completados.

Esta técnica nos permite evaluar otros parámetros como son la cinética de proliferación celular y el índice mitótico

Cinética de proliferación celular.

La cinética de proliferación celular (CPC) es un análisis que resulta muy útil como indicador de las alteraciones en la hematopoyesis inducidas por agentes internos y externos, o por exposición a xenobióticos; aplicada a un cultivo de linfocitos con algún agente, nos sirve para detectar su efecto estimulante o inhibidor sobre la proliferación de dichas células.

Índice mitótico

El índice mitótico (IM) de una población celular o tejido, es una medida de la proporción de células que están en fase de mitosis en un momento particular, se conoce también como índice de proliferación y es un parámetro que ha sido utilizado para determinar el efecto citotóxico de agentes químicos sobre el cultivo de linfocitos humanos, pues pone de manifiesto que han ocurrido cambios bioquímicos, fisiológicos o genéticos en la célula, que la conducen a la muerte [Ostrosky-Wegman, 1993].

5. Viabilidad celular

Es importante confirmar el estado vital de las muestras celulares después de su exposición a un agente con posible actividad citotóxica y puesto que mediante los parámetros observados en la técnica de ICH solo se puede observar si existe modificación en el ciclo celular, pero no sí lo que en realidad esta sucediendo es un efecto citotóxico, es conveniente realizar una prueba de viabilidad celular.

El concepto de viabilidad alude a la capacidad de una célula para realizar sus procesos fisiológicos y bioquímicos, especialmente en lo que respecta a su metabolismo y su capacidad de división. Sin embargo en la práctica el término es relativo, pues se utiliza con diversos criterios; por ejemplo es común que se hable de viabilidad refiriéndose simplemente a la integridad de la célula, o bien a su actividad metabólica o, finalmente, a su capacidad de división (proliferación) [Luque y Herráez, 2001].

Los métodos para medir viabilidad celular son diversos y pueden ser rápidos, generalmente basados en la integridad de la membrana celular por exclusión o captura de colorantes o por inclusión y retención de iones radioactivos ($^3\text{H}^3+$) [Rodríguez, 2004].

Ensayo de exclusión por azul de tripano

Una de las pruebas de viabilidad celular más utilizadas es la prueba de exclusión con azul de tripano [Philips 1973]. El azul de tripano es un colorante soluble en agua cuyos grupos cargados amino y sulfato impiden atravesar las membranas celulares intactas, por lo tanto, tiñe sólo las células muertas o dañadas, las células vivas no se tiñen. Lo anterior nos indica que las células que aparecen claramente teñidas de azul, son consideradas no viables [Fernández y Václav, 1995].

6. Cuachalalate

Es una especie que ha sido muy comercializada por lo que esta considerada en peligro de extinción. La corteza de este árbol la podemos encontrar a la venta en todos los mercados por más pequeños que éstos sean. Se le conoce con el nombre náhuatl de quauhchalalat, de *cuahuitl*, árbol, y *chachalatl*, cierto pájaro hablador, y también como cuachquetchalálatl, maxiterán y volador [Stanley, 1920; Rzedowski, 1978; Baytelman, 1993]. Su nombre científico es *Amphiterygium adstringens* Schiede ex Schecht, pertenece a la familia Anacardeaceae.

Descripción

El cuachalalate es un árbol que alcanza hasta 10 m de altura y de 10 a 40 cm. de diámetro, de tronco generalmente torcido, con pocas ramas gruesas, ascendentes y torcidas, de ramificación simpodial y copa aplanada. Las hojas están agrupadas en las puntas de las ramas en número de tres a cinco, obtusas, desnudas, dispuestas en espiral, aglomeradas en las puntas de las ramas de 6 a 13 cm incluyendo el pecíolo, en el anverso son verde opaco y en el reverso verde grisáceo. Pierde las hojas durante seis meses del año en sus dos sexos, generalmente de noviembre a mayo (Figura 9) [www.amphiterygiumadstringens.net, revisado en mayo 2005; Martínez, 1987].

Las flores masculinas se encuentran en ramillete en las axilas de hojas nuevas, de hasta 15 cm de largo, tienen de cinco a siete estambres que miden de uno a 1.5 mm de largo, con el filamento muy corto y la antera oblonga; ovario ausente. Las flores femeninas se encuentran solitarias en las axilas de las hojas nuevas, poseen un receptáculo globoso, con cinco dientecillos agudos, que contiene un ovario y florece de mayo a junio [Solares y Galvez, 2005].

Los frutos son nueces abultadas y alargadas que están en ramas de color verde pálido, contienen una o dos semillas muy aplanadas de 5 mm de largo (ver Figura 9).



Figura 9. A. Corteza de cuachalalate. B. Muestra del fruto del árbol de cuachalalate. C y D. Árbol de cuachalalate, *Amphipterygium adstringens*.

La corteza externa tiene grandes escamas engrosadas, la parte lisa de la corteza va de gris oscuro a gris plomizo, con numerosas lentículas protuberantes, redondas y pálidas. La corteza interna es de color crema rosado a rosado, fibrosa, con un exudado blanco extremadamente astringente y de olor picante; el grosor total de la corteza es de 10 a 20 mm, sin incluir las escamas (Figura 9).

Reproducción

Este árbol se puede reproducir por semilla y por estaca, siendo esta última una mejor manera de multiplicar esta especie.

Hábitat

Esta especie es de clima cálido, y templado, se encuentra desde los 100 hasta los 1700 msnm. Habita en climas cálido, semicálido y templado. Crece en la selva tropical caducifolia, subcaducifolia, matorral xerófilo y bosques mesófilo de montaña, de encino y pino [SIRE, 2005].

Distribución

Se encuentra en los estados de Jalisco, Colima, Guerrero, México, Puebla, Nayarit, Morelos, Michoacán, Oaxaca y la Cuenca del Balsas, cuyas coordenadas geográficas van de los 22°30' a 15°45' Lat. N. y de 94° a 106° Long. W.

La región que abastece esta corteza se limita solo al estado de Morelos, la mixteca poblana y parte de la cuenca del Balsas, con lo cual sus poblaciones naturales se ven fuertemente impactadas, debido al descortezamiento tradicional, irregular y destructivo.

Manejo

La planta se recolecta en las áreas de distribución natural de la especie y se utiliza parte para autoconsumo y parte se comercializa en mercados locales. Su aprovechamiento está regulado por las normas **NOM-004-RECNAT-1996**, **NOM-005-RECNAT-1997** y **NOM-007-RECNAT-1997**.

Comercialización

La planta seca se vende en mercados locales y regionales. En el Mercado de Sonora se indica como sitio de origen el estado de Guerrero. También se vende en conjunto con *Hetheroteca inuloides* (Árnica) como remedio contra la inflamación.

Usos

La corteza y las raíces han sido usadas tradicionalmente en medicina casera (Tabla 2). La infusión que se obtiene de su cocimiento se utiliza para endurecer encías y como antiséptico para lavar heridas, también es utilizada para tratar coleditiasis, cáncer del tracto gastrointestinal, fiebre, hipercolesterolemia, gastritis, úlceras, quemaduras y heridas recientes de la piel (Mata, 1993). Estudios farmacológicos en esta especie han demostrado que los extractos metanólico y hexánico presentan actividad antiulcerosa e hipocolesterolémica, respectivamente. [Navarrete y col. 1998; Mata y col. 1991].

Tabla 2. Algunas formas de uso en medicina tradicional

| Forma de preparación | Usos | Aplicación |
|----------------------|---------------------------------|------------------------------------|
| Remojado | Cicatrizante | Como agua de uso |
| Pomada | Cicatrizante | Local |
| Jarabe | Tos | Se toma 3 - 4 veces al día |
| Tónico | Fortalecer el pulmón, tos, asma | Se toma de una a tres veces al día |
| Té | Cicatrizante | Se toma varias veces al día |

La corteza del cuachalalate se puede preparar también en tintura o en polvo para uso externo, cuando se prepara en jarabes o tónicos se combina con otras plantas. [Linares y Flores, 1999]

En 1999 Olivera-Ortega y col., aislan los ácidos masticadienónicos y α -hidroximasticadienónico, además de dos mezclas de ácidos masticadienónico/ isomasticadienónico y el ácido hidroximasticadienónico con un compuesto desconocido. Por otra parte también se estudio la acumulación de estos compuestos y su relación con el sexo de la planta y la época del año en la cual se recolecta (Tablas 3 y 4).

Tabla 3. Acumulación de compuestos presentes en *A. Adstringens* en relación al sexo de la planta*

| SEXO | Comp. 1 | Comp.2 | Comp.3 | Comp. 4 |
|-----------|---------|--------|--------|---------|
| Masculino | 1.717 | 0.780 | 0.172 | 0.251 |
| Femenino | 2.329 | 0.912 | 0.368 | 0.056 |

Tabla 4 Acumulación de compuestos presentes en *A. Adstringens* en relación a la época de recolección*

| MES | Comp.1 | Comp.2 | Comp. 3 | Comp. 4 |
|-----------|--------|--------|---------|---------|
| Noviembre | 1.311 | 0.891 | 0.352 | 1.00 |
| Febrero | 1.883 | 0.183 | 0.172 | 1.242 |
| Mayo | 0.852 | 0.617 | 0.0009 | 0.064 |

* Valores mostrados en porcentaje al peso seco de la planta. Comp.1, ácido masticadienónico, comp.2, α -hidroximasticadienónico, comp.3, mezcla de ácidos masticadienónico / isomasticadienónico, com. 4, mezcla de ácidos α -hidroximasticadienónico / compuesto desconocido.

Finalmente Makino y colaboradores (2004) reportan el aislamiento de cinco tirucalenos tipo triterpenos y evalúan su actividad citotóxica en células de leucemia (L - 1210).

Existen estudios realizados en otras plantas de la familia *Anacardeaceae*, en las cuales se encuentran presentes los ácidos anacárdicos, uno de los principales componentes de la corteza de cuachalalate.

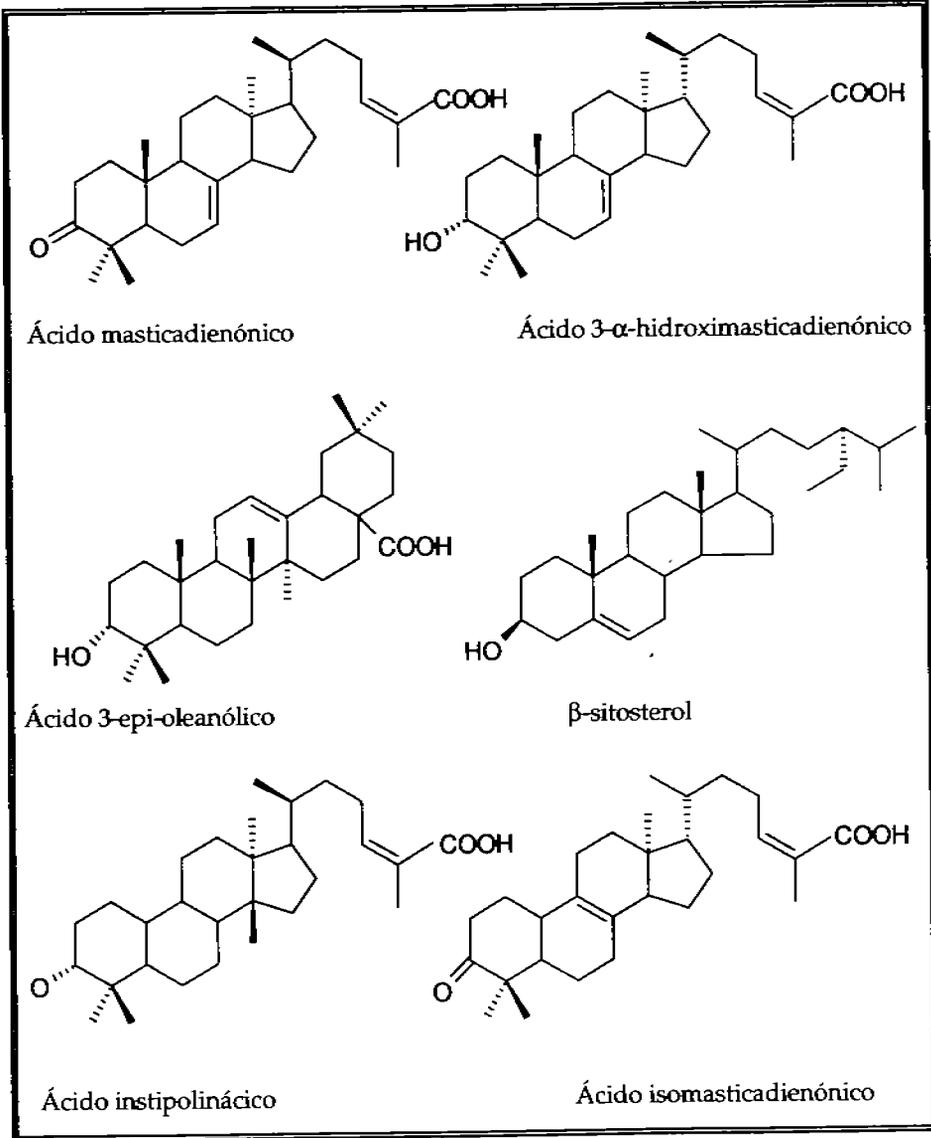


Figura. 10 Estructuras para los compuestos extraídos de *Amphipterygium adstringens* (Rosas, 2000).

Estudios farmacológicos

Debido a la gran cantidad de componentes químicos presentes en la corteza, la mayoría de los estudios farmacológicos se han llevado a cabo con los extractos hexánico y metanólico.

El extracto metanólico ha mostrado efecto inhibitorio, dosis dependiente en úlceras gástricas, además el extracto hexánico y acuoso de la corteza se probaron en dos modelos de inflamación aguda en ratones, edema de oído inducido por 12-*o*-tetradecanoilforbol-3-acetato (TPA) y edema de pata inducido por carragenina, encontrándose que el extracto hexánico posee una actividad dosis dependiente en edema de oído y el extracto acuoso no muestra efecto inhibitorio, sin embargo en edema de pata, el extracto hexánico mostró solo un 14.4% de actividad, y al igual que el caso anterior, el extracto acuoso no mostró actividad, indicando que los extractos poseen diferentes mecanismos de acción antiinflamatoria [Navarrete y col., 1998, Oviedo-Chávez y col., 2004].

En un estudio realizado en ratas mantenidas en ayuno por 24 horas se demostró que la administración subcutánea del extracto hexánico de la corteza induce un efecto hipocolesterolemizante significativo, disminuyendo los niveles de colesterol en un 31% mientras que los fenoles ácidos obtenidos del fraccionamiento del extracto antes mencionado, causan una disminución leve de los niveles de colesterol (6%), y por el contrario, la mezcla de aldehídos incrementa ligeramente los niveles por arriba de la basal [Mata y col., 1991].

También se ha evaluado la actividad cicatrizante del cuachalalate, encontrándose que no aumenta la velocidad de contracción de la herida ni la cantidad de colágena, sin embargo permite una mejor epitelización y remodelación de la cicatriz, favoreciendo la calidad de ésta y evitando que el tejido quede con marcas antiestéticas [Fernández, 2004]

Estudios genotóxicos

Aunque como se ha descrito con anterioridad, la corteza de cuachalalate cuenta con diversos estudios, tanto en el ámbito químico como farmacológico, son pocos los estudios de tipo genotóxico realizados en dicha corteza.

Martínez y Flores (2003) evaluaron el efecto genotóxico del extracto hexánico en prueba de micronúcleos, donde encontraron que dicho extracto no resultó ser genotóxico *per se*, por consecuencia esto indica que los ácidos másticos presentes en el extracto no provocan daño de tipo clastogénico al material genético. Sin embargo, se observó que cuando se administra ifosfamida junto con el extracto, éste presenta una tendencia citotóxica significativa. Por otro lado, también se evaluó el efecto antígenotóxico contra un mutágeno conocido, la ifosfamida, logrando una inhibición de la formación de micronúcleos de hasta el 90%.

Domínguez (2005), realizó un estudio genotóxico de dos ácidos anacárdicos aislados de la corteza de cuachalalate, por medio de la prueba de micronúcleos, determinó que el ácido 6-(nonadecil)-salicílico y su éster metílico no producen daño genotóxico y que solo a la dosis de 10 mg/kg de peso es cuando se obtienen daños citotóxicos.

Ácidos anacárdicos

Los ácidos anacárdicos se han aislado principalmente de *Anacardium occidentale*, *Ginkgo biloba* y *Schoepfia californica*. Se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza y dado que son uno de los componentes principales de cuachalalate es importante mencionar algunas de las propiedades estudiadas.

Se han realizado diversos estudios con este tipo de ácidos, y se ha demostrado que tienen diversas actividades biológicas. Se demostró los efectos de los ácidos anacárdicos, de *Ginkgo biloba*, como inhibidores de glicerol-3-fosfato deshidrogenasa, en crecimiento y síntesis de lípidos en *Bacillus subtilis* y células

3T3-L1 [Masatsune y col. 1996]. Además, también se determinó que los ácidos anacárdicos inhiben a la DNA polimerasa β [Chen y col., 1998]. Toyomizu, y col., [1999] reportan un efecto desacoplante en la fosforilación oxidativa de la mitocondria en hígado, determinando que la cadena alquil y el grupo carboxilo de los ácidos anacárdicos juegan un papel importante en dicho desacoplamiento.

Otro efecto importante atribuido a los ácidos anacárdicos es la inhibición de xantina oxidasa, lo que induce a una disminución de ácido úrico e inhibición de radicales superóxido formados por esta enzima [Masuoka y Kubo, 2004].

Al igual que en cuachalalate, se comprobó que la corteza de *Anacardium occidentale* posee propiedades antiinflamatorias e incluso se reporta un 97% de inhibición en la síntesis de prostaglandinas en vesículas seminales de bovino [Olajide y col., 2004; Ibewuke, 1997].

Recientemente se ha reportado que los ácidos anacárdicos inhiben a la enzima histona acetiltransferasa (HAT) por medio del coactivador transcripcional p300 y PCAF de forma muy efectiva, pero usando una amida derivada del ácido anacárdico se encontró que ésta es la única molécula pequeña activadora de algunas enzimas histonas acetiltransferasas, en este caso p300; significativamente, ésta amida (CTPB) muestra una especificidad exclusiva para la actividad de HAT p300 [Varier, y col., 2004]. Cabe mencionar que esto es muy importante ya que la actividad transcripcional de los genes está asociada con hiperacetilación de histonas, mientras los genes silentes están asociados con hipoacetilación. La acetilación de los residuos de lisina en las regiones amino terminales de las histonas contribuye a neutralizar la carga neta de las histonas, favoreciendo un relajamiento de la estructura nucleosomal, y por lo tanto en la interacción de las histonas con el DNA, esto conlleva a una estructura de la cromatina más relajada favoreciendo la actividad transcripcional, mientras que la desacetilación genera una estructura de la cromatina compacta y, por lo tanto, no se favorece la actividad transcripcional.

Por otra parte, en otra especie de planta, usada en Zimbabwe, *Ozoroa insignis*, se reporta la actividad citotóxica de un ácido anacárdico, el ácido 6-(pentadecil)-salicílico, contra Hep G2 (carcinoma hepatocelular humano), MDA-MB-231 (Adenocarcinoma mamario humano), Hs 578T (Carcinoma de ducto mamario humano), MCF7 (adenocarcinoma mamario humano), SK-MEL-28 (Melanoma humano) y 5637 (Carcinoma primario de vejiga de humano) [Rea, y col. 2003].

Capítulo II. Hipótesis y objetivos

Hipótesis

El extracto hexánico de cuachalalate contiene la mayoría de los componentes químicos presentes en la corteza, por lo que si al evaluar dicho extracto a través del ensayo de intercambios de cromátidas hermanas, la frecuencia de éstos incrementan con respecto al control, entonces se podrá decir que *Amphipterygium adstringens* es una planta que induce daño genotóxico.

Objetivos

OBJETIVO GENERAL: Evaluar la genotoxicidad *in vitro* del extracto hexánico de cuachalalate en cultivo de linfocitos humanos por medio de la técnica de intercambios de cromátidas hermanas para determinar su posible mecanismo de acción anticancerígeno.

OBJETIVOS PARTICULARES:

- Determinar la frecuencia de intercambios de cromátidas hermanas inducidos a diferentes concentraciones por el extracto hexánico de cuachalalate en cultivo de linfocitos humanos.
- Evaluar el índice de replicación y determinar si existe variación de éste a las diferentes dosis. (233, 466, 698 y 931 ng/mL), para conocer si existe modificación del ciclo celular.
- Calcular el índice mitótico y determinar si se modifica a las diferentes dosis. (233, 466, 698 y 931 ng/mL), para establecer si existe daño citotóxico
- Evaluar la citotoxicidad del extracto hexánico de cuachalalate utilizando la prueba de viabilidad celular de azul tripan

Capítulo III. Material y métodos

1. Material

a) Material biológico

Se tomó una muestra sanguínea a un sujeto de 23 años de edad, género masculino, que al momento de la experimentación no se encontraba bajo tratamiento médico y que al menos 48 horas antes no había ingerido bebidas alcohólicas. Se tomó una segunda muestra sanguínea a un sujeto de 22 años de edad, género femenino, aparentemente sano, que al igual que el anterior no se encontraba bajo los efectos de medicamentos y/o bebidas alcohólicas.

b) Material de cristalería

Vasos de precipitados de 50, 100 y 250 mL

Matraces aforados de 10 mL y 25 mL

Probeta de 100 mL

Pipetas estériles de 10 mL

Pipetas graduadas de 5 y 10 mL

Pipetas Pasteur

Tubos de punta de 10 mL

4 tubos de punta estériles de 10 mL

Frascos para cultivo

c) Material diverso

Jeringas de 1, 5 y 10 mL

Algodón

Centrífuga IEC

Balanza granataria Ohaus

Balanza digital Scaltec SBA 42

Alcohol

Cubre objetos

Portaobjetos

d) Material químico

- A) Extracto hexánico de cuachalalate: Se encuentra en forma semisólida y para solubilizarlo se utilizó DMSO. El DMSO es un líquido higroscópico, prácticamente incoloro e inodoro. Densidad 1.1, soluble en agua, etanol, acetona, éter, benceno y cloroformo. DL₅₀ en ratas 17.9 mL/kg.
- B) Heparina 10,000 UI
- C) Solución de colchicina 0.04%
Pesar 0.04 g de colchicina y disolverlos en 100 mL de agua destilada
- D) Solución hipotónica 0.075M
2.796 KCl g en 500 mL agua destilada
- E) Solución fijadora metanol: ácido acético 3:1
metanol absoluto 75 mL : ácido acético glacial 25 mL
- F) Bisbenzimidida Hoeschst 33258
Solución concentrada: 0.025 g en 10 mL agua destilada
Solución de trabajo: 1 mL de solución concentrada
9 mL de agua destilada
10 mL de buffer de diferenciación
- G) Buffer de diferenciación:
Solución A) 1.8 g de citrato trisódico en 50 mL de agua destilada
Solución B) 0.221 g de fosfato de sodio monohidratado en 10mL de agua destilada. Agregar lentamente la solución B a la solución A hasta alcanzar un pH de 7
- H) Solución salina doble de citratos

8.823 g de citrato de sodio
17.532 g de cloruro de sodio
Aforar a 1 litro con agua destilada

I) Colorante Giemsa:

5 mL de colorante Giemsa sigma
5 mL de buffer de fosfatos pH 6.8
40 mL de agua destilada neutra

J) Solución azul de tripano

K) Medio RPMI 1640

L) Fitohemaglutinina Gibco

2. Métodos

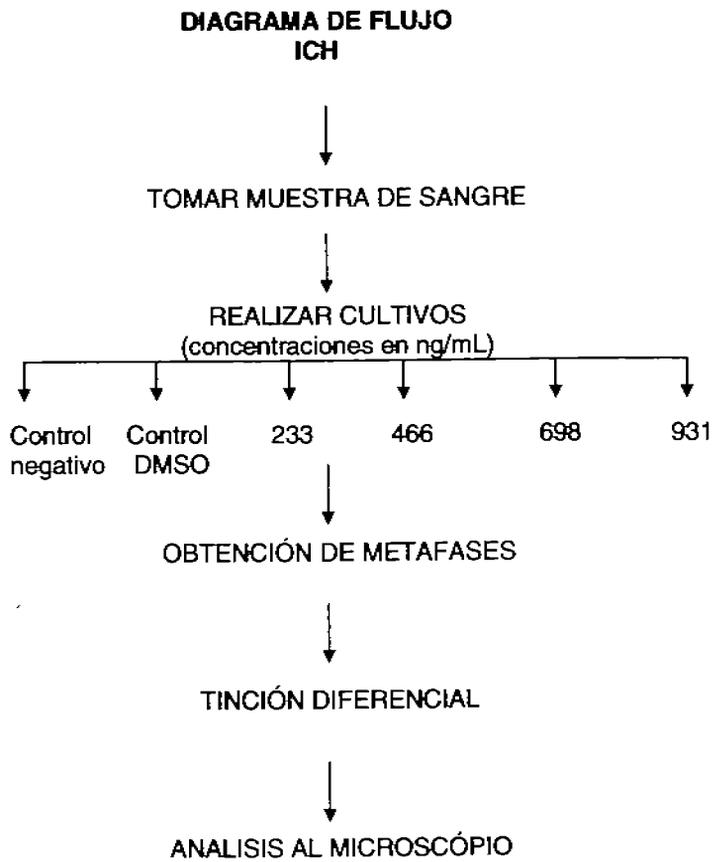


Figura 11. Diagrama de flujo para la obtención de ICH

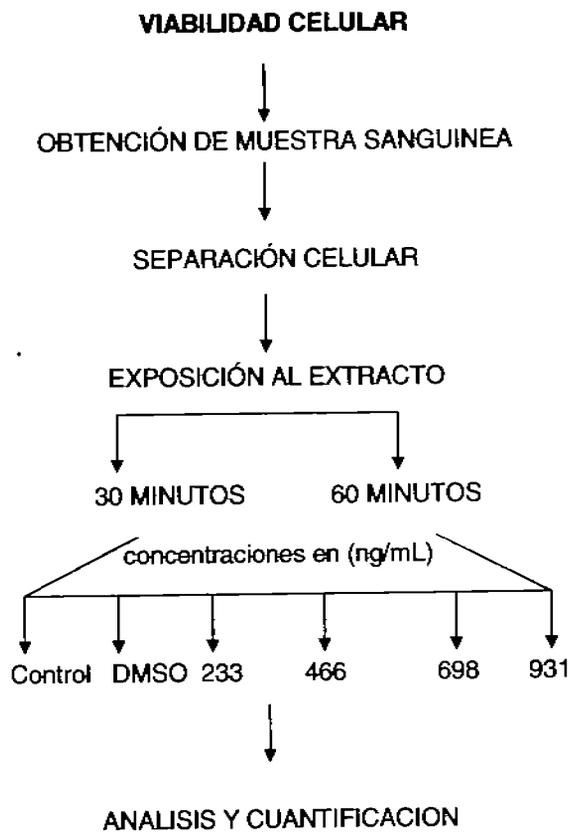


Figura 12. Diagrama de flujo para analizar viabilidad celular.

➤ **Obtención del extracto hexánico e identificación**

La corteza utilizada se compró en un lugar de distribución conocido.

Se realizó la extracción de una muestra de la corteza (130 g) con 500mL de hexano colocándolo a reflujo por una hora, lo anterior se realizó tres veces. Posteriormente, la evaporación del solvente se realizó en un rotavapor, logrando así la separación del extracto.

La corroboración de la autenticidad de la planta se realizó en el laboratorio de Química Medicinal de la FES-Cuautitlán, por comparación del extracto hexánico de la corteza con estándares de los ácidos hidroximasticadienónico y el 3 α -hidroximasticadienónico, corriendo una muestra en HPLC (Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución) en una columna C18 de longitud 3.9 X 150 mm, marca Waters, usando un detector de luz UV (Spectra System p400, Detector System UV 1000). También se identificó por electroforesis capilar, usando un capilar de longitud efectiva de 50cm y una longitud total de 60 cm y un detector de diodos, marca Beckman Coulter [Liliana Sánchez, tesis en proceso].

Las concentraciones a las cuales se trabajó el extracto hexánico de cuachalalate fueron 2.095, 4.189, 6.284 y 8.378 μ g/cultivo

➤ **Intercambio de cromátidas hermanas *in vitro***

A) Toma de muestra

Se obtuvo una muestra de sangre por punción venosa, por medio de una jeringa heparinizada.

B) Muestra control

Se utilizó un control de DMSO y uno de 5-Brdu. Todas las muestras se realizaron por duplicado.

C) Tratamiento de la muestra

Se adicionó a cada tubo estéril 8 mL del medio de cultivo, 4 gotas de fitohemaglutinina y 10 gotas de sangre. El contenido de los tubos se mezcló bien y se incuban en la estufa a 37°C durante 24 horas.

A las 24 horas se agregó 45 µL de 5-brdU a una concentración de 1 mg / mL, además de las diferentes dosis del extracto hexánico de cuachalalate. Se incubaron nuevamente hasta completar 71 horas. Todo lo anterior se trabajó en condiciones de esterilidad.

Una vez transcurrido ese tiempo se agregó a cada tubo 50 µL de colchicina a una concentración de 0.1 mg / mL. Ya no son necesarias las condiciones de esterilidad. Se mezclaron bien los tubos y se continuó la incubación por una hora más.

D) Obtención de preparaciones cromosómicas

Se centrifugaron los tubos a 3000 rpm durante 10 minutos y se retiró el sobrenadante. Se resuspendió el paquete celular y se adicionó 8 mL de KCl 0.075M a 37°C y se incubaron durante 30 minutos a 37°C.

Se volvió a centrifugar durante 5 minutos y se desechó el sobrenadante. Se resuspendió el paquete celular con ayuda de un vórtex y con una pipeta Pasteur. Con agitación constante, se agregó lentamente 8 mL de solución fijadora de metanol-ácido acético (3:1) recientemente preparada y fría, dejando reposar por alrededor de 15 min. Se repitió lo anterior dos veces más sin necesidad de agregar lentamente la solución fijadora.

Después de la última centrifugación se dejó un poco de solución fijadora para hacer una suspensión celular adecuada (aproximadamente 0.5mL). Se resuspendió el paquete celular y se realizaron las preparaciones cromosómicas

por goteo sobre porta objetos limpios y fríos. Las preparaciones se secaron al aire. Las laminillas se dejaron madurar por 24 horas antes de la tinción.

E) Tinción diferencial

Se colocó en cada laminilla 4 o 5 gotas de la solución de trabajo Bisbenzimidida Hoechst y se colocó encima un cubreobjetos para expandirlas. Las laminillas se mantuvieron en la oscuridad por 20 minutos. Una vez pasado el tiempo se colocó alrededor del cubre objetos unas gotas de buffer de diferenciación. Se expusieron las laminillas a la luz UV por una hora y quince minutos, a una distancia no mayor de 2cm de la lámpara.

Se retiraron los cubreobjetos, por inmersión de las preparaciones en un vaso de precipitados con agua desionizada. Se sumergieron las laminillas en un vaso coplin que contenga solución doble de salina-citrato a 60°C por 15 minutos, después se enjuagaron las laminillas en agua caliente y luego en agua fría. Por último se tiñieron las laminillas con Giemsa en buffer de fosfatos pH 6.8 durante 10 minutos.

Se cuantificaron 100 metafases y clasificaron en primera, segunda o tercera división celular para establecer la cinética de proliferación celular. En las metafases de segunda división celular se analizó la frecuencia de ICH, se cuantificaron 25 metafases para calcular el índice de replicación celular de la siguiente manera:

$$IR = \frac{(1 \times \%M1) + (2 \times \%M2) + (3 \times \%M3)}{100}$$

Donde M1 son las metafases de primera división celular, M2 metafases de segunda división celular y M3 metafases de tercera división celular.

➤ **Determinación de la viabilidad celular**

A) Separación de células sanguíneas por gradiente de ficoll-hypaque

- 1) Las células mononucleares periféricas humanas (CMPH) se obtienen a partir de sangre heparinizada
- 2) La sangre se depositó en un tubo de punta sobre un volumen igual de la solución de Ficoll-Hypaque, formando así un sistema bifásico
- 3) Se centrifugó a 300 xg durante 45 minutos, quedando las CMPH en la interfase
- 4) Las CMPH se retiraron con cuidado, se transfirieron a un tubo y lavaron 3 veces con medio de cultivo (200 xg durante 10 minutos)

B) Método de exclusión del azul tripano

La concentración de las células por analizar debe de ser $2-5 \times 10^6$ cel/mL

El azul tripano se prepara al 0.2%(P/V) en agua destilada

Para este ensayo de viabilidad se mezclaron partes iguales de la solución colorante y la suspensión celular después del tratamiento. En cámara de Neu Bawer se contaron las células totales y las coloreadas. Las células muertas toman la coloración azul del tripano, mientras que en las células vivas se observa el núcleo refringente. El porcentaje de viabilidad se calculó como se muestra a continuación:

$$\% \text{ de viabilidad} = (\text{No. De células no teñidas} / \text{No. Total de células contadas}) \times 100.$$

Capítulo IV. Resultados

a) Extracto hexánico

Se obtuvo un extracto de apariencia aceitosa y color verde olivo, con un rendimiento del 3.9%. La identificación de dicho extracto demostró la autenticidad de la planta.

b) Frecuencia de ICH

En la tabla 5, se presentan las frecuencias de ICH por metafase (media \pm desviación estándar) obtenidas en dos pacientes de diferente género, sus controles negativos presentaron una frecuencia de ICH considerada dentro del rango aceptable para este estudio. También se observa la frecuencia de ICH después de exponer los cultivos a diferentes concentraciones del extracto hexánico de cuachalalate. En su gráfico correspondiente (Figura 13), se observa que la frecuencia de ICH no se alteró respecto al control negativo en ambos donadores.

Se realizó una correlación lineal para ambos casos (Figuras 14 y 15), en donde se observa que existe una tendencia a la disminución de ICH con respecto a la concentración de EH. Teóricamente a una concentración mayor de EH se podría obtener una frecuencia de ICH igual a cero.

b) Índice mitótico

En la tabla 6, se muestra el valor de índice mitótico promedio de los dos individuos analizados, obtenido al analizar 1000 células, en este caso se observaron diferencias estadísticamente significativas a las concentraciones de 698 y 931 ng/mL.

c) Índice de replicación y viabilidad celular

En el análisis del índice de replicación (Tabla 6), se encontró que no existen diferencias estadísticas entre ambos donantes por lo que se promediaron los

valores para establecer una gráfica de correlación lineal (Figura 16), en la que se observa que el IR se modifica poco, ya que la pendiente es muy pequeña (0.0000601), y lo cual nos sugiere que no existe modificación en el ciclo celular. La evaluación de la viabilidad celular se llevó a cabo a diferentes concentraciones de HE y a dos tiempos distintos (ver tabla 7). Se estableció la correlación lineal para ambos tiempos no encontrándose diferencias estadísticamente significativas (Figura 17)

Tabla 5. Frecuencias de ICH por metafase en cultivo de linfocitos, expuestos a diferentes concentraciones de extracto hexánico de cuachalalate, correspondientes a dos sujetos de diferente género.

| Tratamiento | Género femenino | | Género masculino | |
|------------------|-----------------|---------------------|------------------|---------------------|
| | X de ICH \pm | Desviación estándar | X de ICH \pm | Desviación estándar |
| Control negativo | 4.93 \pm | 1.73 | 4.12 \pm | 1.36 |
| Control DMSO | 5.44 \pm | 2.29 | 4.28 \pm | 1.79 |
| 233 ng/cultivo | 4.42 \pm | 1.50 | 3.72 \pm | 1.95 |
| 466 ng/cultivo | 4.40 \pm | 1.88 | 3.92 \pm | 1.61 |
| 698 ng/cultivo | 3.36 \pm | 1.381 | 3.92 \pm | 2.18 |
| 931 ng/cultivo | 4.40 \pm | 1.61 | 2.96 \pm | 1.31 |

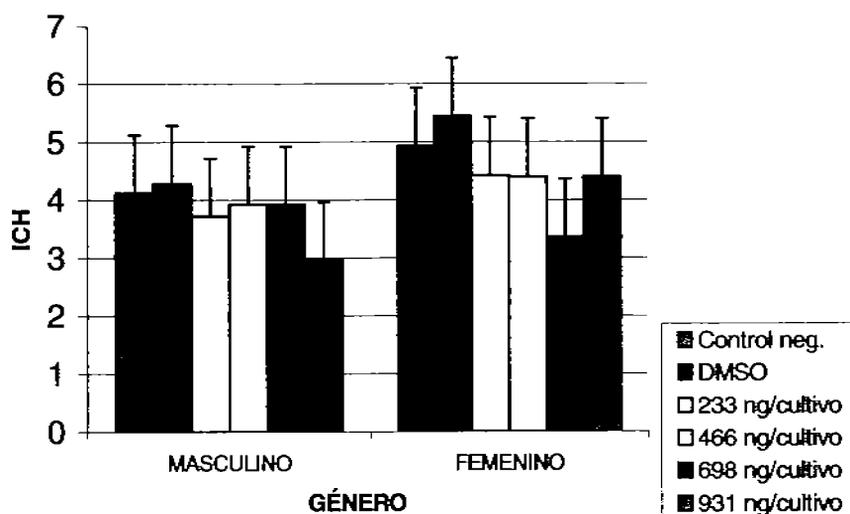


Figura 13. Promedio de ICH encontrados en donadores de diferente género. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas. Los resultados se analizaron realizando un análisis de varianza (ANOVA).

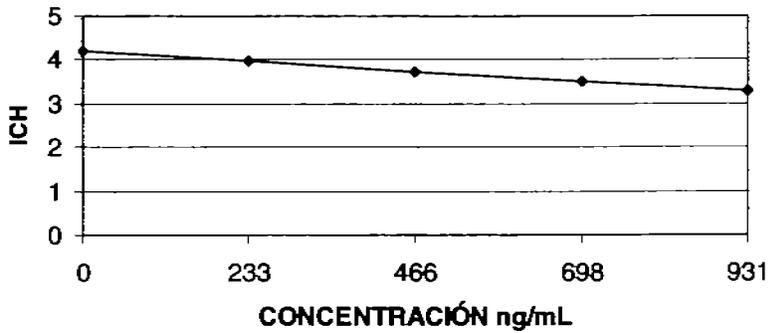


Figura 14. Correlación lineal entre las diferentes concentraciones de extracto hexánico e ICH. $Y = -0.00097X + 4.2$. Datos obtenidos del donador de género masculino.

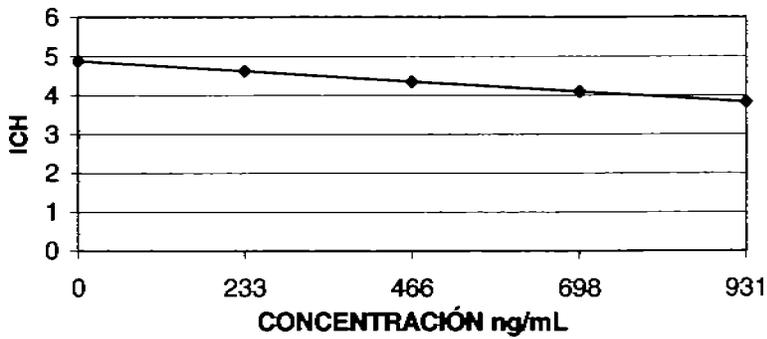


Figura 15. Correlación lineal entre las diferentes concentraciones de extracto hexánico vs ICH, encontrada en el donador de género femenino. $y = -0.00113X + 4.88$

Tabla 6. Índice de replicación, índice mitótico y cinética de proliferación celular, observado en cultivos de linfocitos humanos sometidos a diferentes concentraciones de extracto hexánico de cuachalalate.

| Tratamiento | IM \pm D.E | PROMEDIO DE METAFASES | | | IR \pm D.E |
|------------------|-----------------|-----------------------|------|------|------------------|
| | | 1* | 2* | 3* | |
| Control negativo | 17 \pm 4.24 | 72 | 17.5 | 10.5 | 1.39 \pm 0.035 |
| Control DMSO | 19.5 \pm 0.71 | 62 | 21 | 34 | 1.44 \pm 0.042 |
| 233 ng/cultivo | 12 \pm 1.41 | 59 | 28 | 13 | 1.56 \pm 0.061 |
| 466 ng/cultivo | 10.5 \pm 3.54 | 65.5 | 21.5 | 13 | 1.48 \pm 0.021 |
| 698 ng/cultivo | 7.5* \pm 0.71 | 57.5 | 26 | 17.5 | 1.53 \pm 0.225 |
| 931 ng/cultivo | 10* \pm 0.0 | 66 | 21.5 | 12.5 | 1.36 \pm 0.196 |

*Datos estadísticamente significativos prueba ANOVA para $p \geq 0.05$

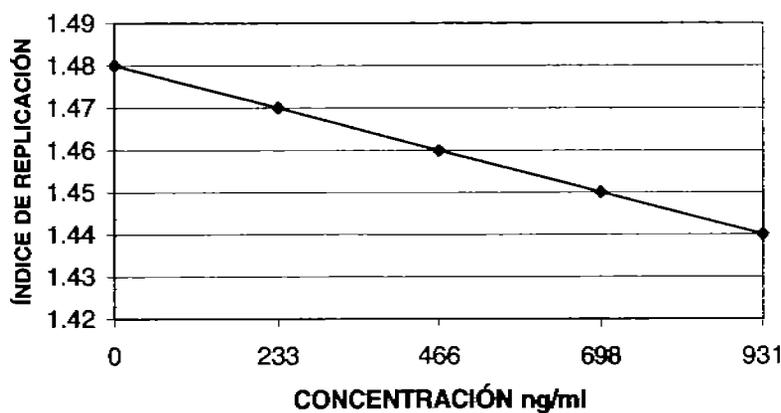


Figura 16. Relación entre diferentes concentraciones de cuachalalate y el índice de replicación, $y = -0.0000601x + 1.48$

Tabla 7. Viabilidad celular después de la exposición a diferentes concentraciones del extracto hexánico, cuantificada a 30 y 60 minutos.

| CONCENTRACIÓN TIEMPO DE EXPOSICIÓN | % DE VIABILIDAD | |
|---------------------------------------|-----------------|------------|
| | 30 MINUTOS | 60 MINUTOS |
| CONTROL | 94.65 | 92.28 |
| 233 ng/mL | 87.17 | 93.14 |
| 466 ng/mL | 91.74 | 91.69 |
| 698 ng/ mL | 94.10 | 90.93 |
| 931 ng/ mL | 86.70 | 95.44 |

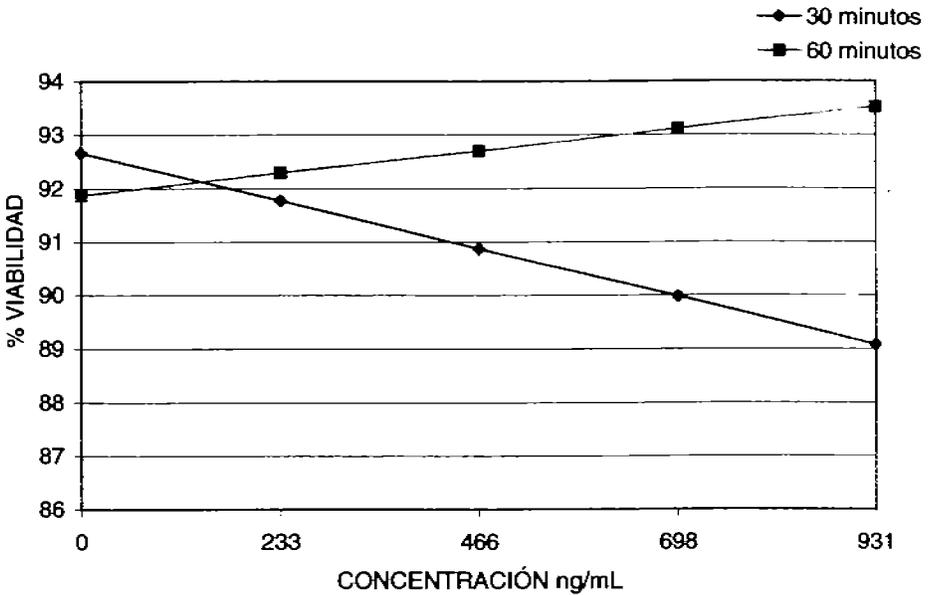


Figura 17. Se muestra la relación lineal de la concentración de extracto hexánico respecto a la viabilidad celular. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en prueba de t pareada.

Capítulo V. Discusión

El conocimiento de las virtudes de las plantas medicinales es uno de los vínculos más directos que existen entre la medicina empírica del pasado y la Farmacología actual [Viesca, 1993].

Algunas sustancias químicas que fabrican las plantas tienen importancia médica y ambiental porque tienen efectos letales, por ejemplo, sobre las células cancerosas, o pueden usarse en el ambiente para controlar algunas especies de animales, en especial invertebrados [Klaassen y Watkins, 1999].

Hasta el siglo XX, cuando hubo una notoria desviación de la medicina hacia el uso de sustancias químicas puras como fármacos, la intoxicación no intencional por plantas era frecuente. Es por eso que hoy en día con el fuerte resurgimiento mundial de la práctica de la herbolaria se busca evaluar, el efecto farmacológico y toxicológico de los fitofármacos, de una manera más precisa a como se realizaban en el pasado.

En el presente estudio se expusieron cultivos de linfocitos humanos a dosis crecientes de extracto hexánico (HE) de *Amphipterygium adstringens*. Se decidió preparar un extracto de tipo hexánico debido a que en el extracto metanólico y acuoso las cantidades de ácido masticadienónico no son detectables por los métodos comunes de cuantificación (Rosas y col. datos no publicados), además de que en el extracto acuoso tampoco se confirma la presencia del ácido 3 α -hidroximasticadienónico, por lo que al realizar el extracto hexánico se pretende concentrar la mayoría de los componentes químicos presentes en la corteza ya que el objetivo es evaluar su potencial genotóxico.

Las concentraciones utilizadas en los cultivos se seleccionaron mediante pruebas previas, en donde se observó que a concentraciones por arriba de 700 ng/mL no se obtiene crecimiento celular óptimo para este estudio.

El ensayo de ICH es de gran valor para la detección de potencial genotóxico y carcinógeno, representa un cambio simétrico de las cadenas complementarias de DNA entre cromátidas dentro de un mismo cromosoma [Swierenga y col., 1991] Esta prueba ha sido seleccionada para determinar el potencial genotóxico de otros extractos de plantas, por ejemplo, de *Chenopodium ambrosioides* y *Sanguinaria canadensis* [Gadano y col., 2002; Das y col., 2004], que son utilizadas en la medicina tradicional de América Latina.

Gadano y colaboradores, demostraron que la infusión de *Chenopodium ambrosioides* induce efectos genotóxicos, por un incremento en la frecuencia de ICH y una disminución en el índice mitótico (IM) proporcional a la concentración utilizada. Por otro lado Das y colaboradores, al realizar la prueba de ICH utilizando un alcaloide de *Sanguinaria canadensis* encontraron que éste es genotóxico puesto que incrementa la frecuencia de ICH, pero no es citotóxico ya que no modifica el índice de replicación.

Los datos presentados en la tabla 5 y figura 13 muestran que el EH de cuachalalate en comparación con el control negativo no incrementa la frecuencia de ICH, demostrándose así que no existe interacción de los principios activos presentes en el EH y el DNA, por lo tanto también se puede decir que no se trata de agentes que ocasionen daño de tipo S-dependientes, pues como ya se mencionó el ensayo de ICH es susceptible a detectar daño genotóxico inducido por este tipo de agentes. Este resultado concuerda con lo obtenido por Flores y Martínez (2003), quienes al evaluar el EH de cuachalalate por medio del ensayo de micronúcleos demostraron que dicho extracto no produce daño de tipo clastogénico. Esto es importante, ya que hasta este punto se ha demostrado que el EH de cuachalalate no induce daño genotóxico al ser evaluado por dos ensayos que detectan genotoxicidad.

Lo anterior también se puede observar en los gráficos de correlación lineal (figura 15 y 16), en donde para ambos casos existe una pequeña tendencia por parte del extracto a disminuir la frecuencia de ICH, lo que nos hace pensar que existe un mecanismo por el cual el EH de cuachalalate no permite que las células dañadas entren a división celular. Este caso se puede tratar de dar explicación mediante los otros parámetros analizados, el índice de replicación (IR) e índice mitótico (IM).

El índice de replicación nos indica si la sustancia probada modifica el ciclo celular, ya sea acelerando o retardando la división. En este caso no se observó modificación alguna, lo que indica que el EH no actúa sobre el ciclo celular. Sin embargo, al analizar el IM se observa que a las concentraciones más elevadas de EH (698 y 931 ng/mL) se reduce el número de células que entran en mitosis, por lo que se puede inferir que el EH de cuachalalate actúa probablemente en la fase G2 después de la replicación de DNA y antes de que las células entren a mitosis o propiamente sobre la fase mitótica, el mecanismo aún no se puede explicar. Este punto es muy importante pues hay que recordar que las células cancerosas se caracterizan por una elevada entrada a la fase mitótica y que existen dos puntos de restricción dentro del ciclo celular y uno de ellos es de G2 a M [Paniagua, 2002].

Analizando ambos parámetros, IR e IM, se observa que existe una disminución del número de células que entran en la fase mitótica, pero que las células que lo hacen no modifican su IR, es decir, la división celular se lleva a cabo de forma normal.

Los estudios de citotoxicidad se han realizado principalmente con ácidos anacárdicos en donde, como ya se ha mencionado, se ha detectado una gran influencia citotóxica sobre células de diferentes líneas cancerosas; poco es lo que se ha realizado al respecto en ácidos masticadienónicos, principales componentes de la corteza de cuachalalate, por ejemplo, en un estudio se observó que existe citotoxicidad en leucocitos polimorfonucleares a una concentración de 30 μ M y

100µM [Giner-Larza, y col., 2002]. Sin embargo, en este caso no se encontró ningún efecto citotóxico ejercido por el EH a las concentraciones ensayadas sobre linfocitos. Una explicación de lo que sucede es que las concentraciones a las cuales se colocó el EH son pequeñas para alcanzar la concentración citotóxica reportada, así, se tendría que colocar entre 333.3 mg y 1000 mg de EH para lograr observar un efecto citotóxico. Además es importante tomar en cuenta que estos datos se pueden modificar un poco ya que como se mostró en las tablas 3 y 4 la concentración de los componentes químicos de la corteza de cuachalalate dependen tanto del sexo de la planta como de la época de recolección, por lo que las cantidades de EH necesarias para causar citotoxicidad pueden variar ligeramente.

Por otro lado, cabe mencionar que la prueba realizada para evaluar viabilidad celular es una prueba de exclusión, que valora el efecto citotóxico por medio de la integridad de la membrana, pero no ayuda a determinar si las células perdieron su actividad metabólica o si se encuentran en un estado de apoptosis, lo cual daría más indicios sobre el posible mecanismo de citotoxicidad del cuachalalate.

Hasta el momento el cuachalalate se perfila como una alternativa probable para el tratamiento de cáncer pero aún quedan muchas cosas por hacer, por ejemplo es importante realizar pruebas de citotoxicidad del EH más específicas, realizar el presente estudio *in vivo*, para determinar si es posible que los metabolitos ejerzan otros efectos o definir cual de los componentes del EH son los que manifiestan mayor actividad.

Capítulo VI. Conclusiones

- El extracto hexánico de cuachalalate no modifica la frecuencia de ICH a las concentraciones ensayadas (233, 466, 698 y 931 ng/mL), por lo tanto no induce daño genotóxico.
- El extracto hexánico de cuachalalate no modifica el índice de replicación y por ende el ciclo de división celular a las concentraciones de 233, 466, 698 y 931 ng/mL
- El extracto hexánico de cuachalalate logra modificar el IM a las concentraciones de 698 y 931 ng/mL
- No se presenta citotoxicidad por parte del extracto hexánico de cuachalalate sobre células polimorfonucleares a las concentraciones probadas (233, 466, 698 y 931 ng/mL)

Capítulo VII. Bibliografía.

- Aristel, C., Guerrieri, P. y Anselmo, P. 2004. **Sister chromatid exchange and micronuclei frequency in early-stage breast cancer patients: preliminary results of a prospective observational study.** European Journal of Cancer Supplements 2(3):182.
- Baytelman, B. 1993. "Acerca de plantas y curanderos". INAH. México. pp 96-98
- Bello, J. y López de Cerain, A. 2001. "Fundamentos de ciencia toxicológica". Ed. Díaz de Santos. Madrid, España.
- Bestor, T. 2000. The methyltransferases of mammals. Hum. Mol. Genet. 9: 2395-2402
- Bird, A. 2002. DNA methylation patterns and epigenetic memory. Genes Dev. 16: 6-21..
- Brusick, D. 1982. "Genetic Toxicology". In principles and methods of toxicology. Hayes, W. Rev. Press. New York, USA.
- Crighton, D. y Ryan, K. 2004. Splicing DNA-damage responses to tumor cell death. Biochimica et biophysica Acta 1705: 3-15.
- Chen J., Zhang, Y., Wang, L., Sucheck, S., Snow, A. y Hecht, S. 1998. Inhibitors de DNA polimerasa β from *Schoepfia californica*. Chem. Commun. 2769-2770.
- Dhillon, U., Bhasker, R., Kler, R. y Husain, S. 1995. **Sister Chromatid exchange (SCE) studies in breast cancer patients: a follow-up study.** Cancer Genet Cytogenet 80: 115-117.

Das, A., Mukherjee, A. y Chakrabarti, J. 2004. **Sanguinarine: an evaluation of *in vivo* cytogenetic activity.** Mutation Research 563: 81-87.

Domínguez, M. 2005. **Actividad genotóxica del ácido 6-nonadecil salicílico aislado de la corteza de cuachalalate y su éster metílico evaluada en sangre periférica de ratones CD1 en la prueba de micronúcleos.** Tesis QFB FES-Cuautitlán. UNAM. México.

Domínguez, X., Franco, R., García, S., Porras, M., Vázquez, G. y Amezcua, B. 1983. **Plantas medicinales mexicanas XLVIII: Estructura del ácido instipolinámico separado de la corteza de Cuachalalate (*Amphipterygium adstringens*).** Revista Latinoamericana de Química 14:99-100

Etienne, J. 2000. " **Bioquímica genética, Biología molecular**". Masson. Barcelona, España. pp 194-196

Fernández, J. 2004. **Valoración del efecto cicatrizante del Cuachalalate (*Amphipterygium adstringens*) en lesiones cutáneas de rata wistar.** Tesis Facultad de química. UNAM. México.

Fernández, R. y Václav, V. 1995. "**Methods in cellular immunology**". CRC. Press. Boca Raton, USA.

Finn, G. 2000. "**Histología**". 3ª edición. Ed. Médica Panamericana. Buenos Aires, Argentina.

Gadano, A., Gumi, A., López, P., Ferraro, G. y Carballo, M. 2002. ***In vitro* genotoxic evaluation of the medicinal plant *Chenopodium ambrosioides* L.** Journal of Ethnopharmacology 81:11-16.

García, R. 2003. **Epigenética: una explicación de las enfermedades hereditarias**. Perinatol Reprod Hum. 17: 56-60. Disponible en www.imbiomed.com.mx.

Gardner, J., Simmons, M. y Snustad, P. 2003. "Principios de genética". 4ª edición, Limusa Wiley, México D.F. pp. 467-469.

Giner-Larza, E., Manez, S., Giner, R., Recio, C., Prieto, J., Cerda-Nicolás, M. y Ríos J. 2002. **Anti-inflammatory Triterpenes from *Pistacia terebinthus* Galls**. Planta médica 68: 311-315.

Goodman, A. 2001. "Las bases farmacológicas de la terapéutica". Vol II. 10ª edición, Mc Graw- Hill. México pp. 1398-1462

González, E.E. y Delgado, J.N. 1962. **Phytochemical investigation of *Amphipterygium adtringens***. Journal Pharmaceutical Science 51:901-905

González, E.E, Mckena, G. y Delgado, J. 1962. **Anticancer evaluation of *Amphipterygium adtringens***. Journal Pharmaceutical sciences 51:642-651

Guizar, J. 1996. "Genética clínica". Diagnóstico y manejo de las enfermedades hereditarias. El Manual Moderno, México, D.F.

Hirch, B.A, Sentz, K. y McGue, M. 1990. **Genetic and enviromental influences on baseline SCE**. Env. Mol. Nut. 20: 2-11.

Hoo, J. y Parslow, I. 1979. **Relation between the SCE points and the DNA replication bands**. Chromosoma 73:67-74.

Jiménez, L., Merchant, H. 2003. "Biología celular y molecular". pp 617-619. Person education. México, D.F.

Karp, G. 1998. "Biología celular y molecular". Mc Graw-Hill Interamericana. México, D.F.

Katto, H. 1977. **Mechanisms for sister chromatid exchanges and their relation to the production of chromosomal aberrations.** Chromosoma 59:179-191.

Katzung, B. 2002. "Farmacología básica y clínica". El Manual Moderno, México, D.F.

Klassen, D. y Watkins, J. 1999. "Manual de toxicología". 5ª edición, Mc Graw – Hill, México, D.F. Pág. 792.

Klug, W. y Cummings, M. 1999. "Conceptos de genética". 5ª edición, Prentice Hall. México, D.F. pp 626-631

Kuklinsk, C. 2000. "Farmacognosia". Ed. Omega, Barcelona, España. pp 371-379.

Latt, S. y Shreck, R. 1980. **Sister chromatid exchanges analysis.** Hum. Genet. 32: 297-313.

Linares, M., Bye, R. y Flores, B. 1999. "Plantas Medicinales de México usos y remedios tradicionales". Instituto de Biología UNAM, México, D.F.

López, F. 2002. **El ciclo celular bien vale un galardón.** Ciencia 53(1): 74-77

Luque, J. y Herráez, A. 2001. "Biología molecular e ingeniería genética". Ed. Harcourt, Madrid, España.

Manson, A., Jones, E., y Morris, A. 2003. "Lo esencial en célula y genética". 2ª edición. Elsevier, Madrid, España. pp 72-74 y 164-165

Makino, M., Montegi, T. y Fujimoto, Y. 2004. **Tirucallane-type triterpenes from *Juliana adstringens***. *Phytochemistry* 65:891-896.

Martínez, M. 1987. "Catálogo de nombres vulgares y científicos de plantas mexicanas". Fondo de Cultura Económica, México, D.F.

Martínez, E. y Flores, G. 2003. **Estudio de la acción anticlastogénica del cuachalalate (*Amphipterygium adstringens*) sobre la inducción de micronúcleos producidos por ifosfamida**. Tesis de licenciatura. FES-Cuautitlan, UNAM, México, D.F.

Martínez, W. y Folle, G. 2005. **Alteraciones cromosómicas**. Facultad de Ciencias, UNAM, México, D.F.

Masuoka, N. y Kubo, I. 2004. **Characterization of xanthine oxidase inhibition by anacardic acids**. *Biochimica et Biophysica acta* 1688: 245-249.

Mata, R., Calzada, F., Navarrete, A., del Río, F. y Delgado, G. 1991. **Long-chain Phenols from the bark of *Amphipterygium adstringens***. *J. Ethnopharmacol.* 34, 147-154.

Mata, R. 1993. "Chemical studies and Biological Aaspects of Some Mexican Plants used in Tradicional Medicine". *Phytochemical potential of tropical plants*. New York, USA. pp 41-64.

Mojica, T. y Ramos, F. 2001. "Genética molecular humana". Ed. Celsus, Bogotá, Colombia.

Morales-Ramírez, P. 1988. **El daño a la información genética y los intercambios entre cromátides hermanas**. *Ciencia y desarrollo* 81: 65-72.

- Navarrete, A. 1982. **Estudio químico y pruebas farmacológicas preliminares de la corteza de *Juliania adstringens* (cuachalalate)**. Tesis profesional Químico Farmacéutico Biólogo, ENEP-Zaragoza, UNAM, México, D.F.
- Navarrete, A., Mata, R. y Delgado, J.M. 1989. **Alkylsuccinic acids for *Amphipterygium adstringens***. *Planta medica* 55:579.
- Navarrete, A., Martínez, L. y Reyes, B. 1998. **Gastroprotective activity of the Stem Bark of *Amphipterygium adstringens* in rats**. *Phytoterapy Research* 12:1-4
- Olajide, A., Aderogba, M., Adedapo, A. y Makinde, J. 2004. **Effects of *Anacardium occidentale* stem bark extract on in vivo inflammatory models**. *Journal of Ethnopharmacology* 95:139-142
- Olivera, O., Soto, H., Martínez, V., Terrasa, S., y Solares, A. 1999. **Phytochemical Study of cuachalalate (*Amphipterygium adstringens*, Schiede ex Schlecht) J**. *Ethnopharmacology* 68: 109-113.
- Orozco, E. y Gariglio, P. 1999. **“Genética y biomedicina molecular”**. Noriega editores, México, D.F. pp 187-189.
- Ostrosky, P. 1993. **El índice mitótico y la cinética de proliferación celular linfocitaria en el monitoreo biológico**. *Gaceta Médica México* 130: 432-437.
- Oviedo- Chávez, I., Ramírez, T., Soto, M. y Martínez, M. 2004. **Principles of the bark of *Amphipterygium adstringens* (Julianaceae) with anti-inflammatory activity**. *Phytomedicine* 11:436-445.
- Painter, B. 1980. **A replication model for sister chromatid exchange**. *Mutat. Res.* 70: 337-3341.

Paniagua, R. 1999. "**Biología celular**". Ed. Mc Graw-Hill Interamericana. México, D.F. pp. 310-311

Paniagua, R. 2002. "**Citología e histología vegetal y animal**". 3ª edición. Ed. Mc Graw Hill interamericana. Madrid, España. pp 327-336

Parke, D. 1969. **Metabolism of toxic substances**. Brit. Med. **25**: 256-259

Pérez-Herrera, N., Cevallos-Quintal, J. y Pinto-Escalante, D. 1999. **Prevalencia de Intercambios de Cromátides Hermanas en una población libre de exposición a agentes clastogénicos**. Rev. Biomed. **10**: 71-76.

Perry, P. y Wolf, S. 1974. **New giemsa method for the differential staining of sister chromatids**. Nature **251**: 156-158.

Philips, H. 1973. "**Dye exclusion test for cell viability in tissue culture: methods and applications**". Academic Press New York, USA. pp. 406-408

Rea, A., Schmidt, J., Setter, W, Sibanda, S., Taylor, C. y Gwebu, E. 2003. **Cytotoxic activity of *Ozora insignis* from Zimbabwe**. Fitoterapia **74** : 732-735.

Richardson, D. y Le. 2002. **The role of iron in cell cycle progresión and the proliferation of neoplastic cell**. Biochimica et Biophysica Acta **1603**: 31-46.

Riddihough, G. y Pennisi, E. **The evolution of epigenetics**. Science **293**(5532): 1063-1067.

Ritschel, W. 1983. "**Handbook of basic pharmacokinetics**". Hamilton, Drug intelligence. Washington D.C., USA.

Rodríguez-Cabo, J. 2004. **Evaluación de la citotoxicidad de xantomas naturales y sus derivados acetilados y metilados en líneas celulares tumorales**. Tesis QFB. Facultad de Química. UNAM, México, D.F.

Rosas, A.H. 2000. **Análisis fitoquímico de *Cytocarpa procera* HBK y *Amphipterygium adtringens*. Schiede ex schecht**. Tesis de maestría Colegio de posgraduados de Chapingo. Instituto de recursos naturales Estado de México.

Rzedowski, J. 1978. **"Vegetación en México"**. Ed. Limusa, México, D.F. Pag. 210.

Salamanca, F. 1990. **"Citogenética humana"**. Ed. Médica panamericana. México, D.F.

Sherr, C. 1994. **G1 phase progresión: cycling on cue**. Cell 79: 551-555.

Sherr, C. 2000. **The pezcoller lecture: cancer cell cycles revisited**, Cancer Research 60:3689-3695.

Solari, A. 2000. **"Genética humana"**, 2ª edición. Ed. Médica Panamericana. México, D.F.

Soriano-García, M., Toscano, R., Ortiz, B., Navarrete, A., Sánchez-Obreón, Barrios, H. y Yuste, F. 1987. **Structure and Stereochemistry of the methyl ester of (5 α , 13 α , 14 β , 17 α , 20s, 24z) 3-oxolanosta-7,24-dien-26-*oic*-acid (masticadienonic acid)**. Acta Crystallographyca 34:990-992.

Spitz, M. y Bondy, M. 1993. **Genetic susceptibility to cancer**. Cancer 72: 991-995.

Stanley, P. 1920. **"Trees and Shrubs of Mexico"**. vol 23 United Status National Museum, Washington, USA. pp 672-673.

Swierenga, S., Heddle, J., Sigal, E., Gilman, J., Brillinger, R., Douglas, G. y Nestmann, E. 1991. **Recommended protocols based on a survey of current practice in genotoxicity testing laboratories**, IV. Chromosome aberrations and sister chromatid exchange in Chinese hamster ovary, V79 chinese hamster lung human lymphocyte cultures. *Mutation Research* **246**: 301-322.

Takehisa, S., Kanaya, N. y Rieger, R. 1982. **Induction of SCE in CHO cells by extracts from *Vicia faba* roots exposed to ethanol**. *Mutation Research*, **105**: 169-174

Tice, R., y Hollaender, A. 1984. **"Sister chromatid exchanges, 25 years of experimental research"**. Plenum press. New York, USA.

Tortora, G. y Grabowski, S. 2002. **"Principios de anatomía y fisiología"**. 9ª edición. Oxford University Press. México, D.F. pp 93-101.

Toyomizo, M., Okamoto, K., Ishibashi, T., Chen, Z. y Nakatsu, T. 2000. **Uncoupling effect of anacardic acids cashew not Shell oil on oxidative phosphorylation of rat liver mitochondria**. *Life Sciences* **66**(3) 229-234.

Tucker, J., Auletta, A., Cimino, W., Deafield, K., Jacobson-Kram, D., Tice, R. y Carranco, A. 1993. **Sister chromatid exchange**. Second report of the gene-tox. Program. *Mutation Research* **297**: 101-180.

Variar, R., Swaminathan, V., Batasubramanyam, K. y Kundu, T. 2004. **Implications of small molecule activators and inhibitors of histone acetyltransferases in chromatin therapy**. *Biochemical pharmacology* **68**: 1215-1220.

Verma, R. y Babu, A. 1995. **"Human Chromosomes"**. Principles and Techniques. 2a edición. Mc Graw-Hill. USA.

Viesca, T. 1993. "La Herbolaria medicinal en México prehispánico". La investigación científica en la herbolaria medicinal. Secretaria de Salud. México, D.F.

Vousden, K. y Woude G. 2000. **The ins and outs of p53**. *Natural Cell. Biol.* 2: E178-E180.

Vousden, K. 2002. **Activation of the p53 tumor suppressor protein**. *Biochimica et biophysica acta* 1602: 47-59.

Watson, W., Domínguez, X., Vázquez, G. y García, S. 1987. **Cuachalalic acid, a new triterpene from *Amphipterygium adstringens***. *Revista Latinoamericana de Química.* 18: 89-90.

West, A., Gaszner, M. y Felsenfeld, G. 2002. **Insulators: many functions, many mechanisms**. *Genes Dev.* 16:271-288.

Wolffe, A. 1994. **Insulating Chromatin**. *Curr. Biol.* 4: 85-87.

Amphipterygium adstringens. Disponible en <http://www.amphipterygiumadstringens.net> (Revisado en mayo 2005)

Cortés, E., Leal, E. y Leal, C. 2005. **Estudio de la inestabilidad cromosómica y de la actividad transcripcional (18s y 28s) en pacientes con cáncer cervicouterino.**

Disponible en:

[www.sisbib.unmdm.edu.pe/bvrevista/acta_cancerol%
lz_citogeneticos.htm](http://www.sisbib.unmdm.edu.pe/bvrevista/acta_cancerol%c3%b2gica/volxxx_N1_jul/analiz_citogeneticos.htm)

Omega-ILCE. **Los sistemas biológicos de prueba**. Disponible en: <http://omega.ilce.edu.mx:3000/sites/ciencia/volumen3/ciencia3/124/htm/sec-8.htm>

Rodríguez –Reyes, R. y Morales-Ramírez, P. 2005. **Nueva evidencia de que los ICH ocurren durante la síntesis de DNA.** ININ. Disponible en: www.vani.mx/publicaciones/respyn/especiales/genetica/toxicologia_y_farmacologia.htm

SIRE: www.canafor.gob.mx

Solares, F. y Galvez, M., 2005. **Conservación y manejo de recursos.** XV Congreso mexicano de botánica.
Disponible en <http://www.socbot.org.mx/disco/resume/re656.htm>