



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
CUAUTITLÁN**



Departamento de  
Estudios Profesionales

**ESTUDIO DE LA CAPACIDAD APOPTOTICA  
DEL CUACHALALATE (*Amphipterygium adstringens*)  
EVALUADA CON EL ENSAYO COMETA  
(*Electroforesis unicelular en gel*)**

**T E S I S**  
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
**QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**  
P R E S E N T A :  
**MARTHA BEATRIZ JIMÉNEZ AGUILAR**

ASESORA: DRA. SANDRA DÍAZ BARRIGA ARCEO

CUAUTITLÁN, IZCALLI, EDO. DE MÉXICO

2004

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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



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

ASUNTO: VOTOS **APROBATORIOS**



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

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

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

Estudio de la capacidad espontánea del cuachalalate  
(Amphipterygium adstrinzens) evaluada con el ensayo cometa  
(electroforesis unicelular en gel)

que presenta la pasante: Martha Beatriz Jiménez Aguilar  
 con número de cuenta: 9514113-8 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 14 de Mayo de 2004

PRESIDENTE QFB. Ma. Esther Revuelta Miranda

VOCAL Dra. Sandra Díaz Barriga Arceo

SECRETARIO QFB. Martha Patricia Campos Peón

PRIMER SUPLENTE QFB. Juan Chiu Chan

SEGUNDO SUPLENTE QFB. Rosalba Bonilla Sánchez

## DEDICATORIAS

A Dios

Por permitir que llegara este momento tan importante en mi vida y sobre todo por estar siempre conmigo.

A mi papá

Te doy las gracias ya que sin tu apoyo no hubiera logrado este sueño, por que no sólo me impulsaste y ayudaste económicamente sino que me enseñaste a que un papá no es un "abastecedor" si no un amigo con el que se puede contar en las buenas y en las malas. Se que casi nunca te digo lo que siento pero este es un momento para decirte que te quiero mucho.

A mi mamá

A ti que además de ser madre has sido mi mejor amiga con la cual puedo contar siempre, te dedico este trabajo ya que no tengo con que pagarte todos tus desvelos y consejos. Gracias por enseñarme a que no es malo decir lo que siento y por esto mismo quiero decirte que te amo y deseo que este triunfo lo sientas como tuyo. Eres la mejor mamá del mundo y si Dios me hubiera dado la oportunidad de escoger a una madre sin dudarlo te escogería a ti.

A mis hermanos

Por el apoyo incondicional que siempre recibí de su parte y aunque nunca se los he dicho los quiero mucho.

A mis abuelos. Especialmente a Papacito

Por que siempre creíste en mi y me apoyaste, y aunque ya no estés conmigo se que donde te encuentres te sentirás orgulloso de mi

A mi asesora Dra. Sandra Díaz

Por toda la comprensión y confianza que recibí de usted ya que nunca me dio un regaño sino un consejo para salir adelante, le agradezco y le doy las gracias de corazón ya que sin su ayuda no hubiera llegado este momento tan importante.

A mis tíos

No hago mención especial por que recibí apoyo de todos ustedes muchas gracias por creer en mí.

A mis primos. Especialmente a Ana

Ustedes siempre me apoyaron y no tengo con que agradecerles, sientan esta felicidad como suya. Gracias

A mis amigos : Ivonne, Ivet, José Juan

Por sus consejos y por estar conmigo siempre, les doy las gracias por aguantarme y darme su amistad, se que no se encuentran amigos tan fácilmente pero al encontrarlos a se que la amistad sí existe.

Para Armando

Por que creíste en mí, me apoyaste y me has dado tu cariño, tú sabes lo que siento por ti. Gracias por tu apoyo pero sobre todo por soportarme. Te quiero un buen

Al jurado

Por la comprensión y apoyo que he recibido de ustedes. Muchas gracias

A mis maestros

Por transmitir sus conocimientos a todos sus alumnos gracias profesores.

## ÍNDICE GENERAL

Índice de figuras	i
Abreviaturas	ii
Resumen	iii

## CAPITULO 1 INTRODUCCION

1.1 Herbolaria	1
1.2 Cuachalalate	4
1.3 Antecedentes y definición de Apoptosis	11
1.3.1 Biología molecular de la Apoptosis	15
1.3.2 Métodos de detección de apoptosis	17
1.4 Ensayo Cometa	19
1.5 Peróxido de Hidrógeno	24

## CAPITULO 2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo General	29
2.2 Objetivos Particulares	29

## CAPITULO 3 MATERIALES Y METODOS

3.1 Material Biológico	30
3.2 Métodos	30

CAPITULO 4 RESULTADOS	35
-----------------------	----

CAPITULO 5 DISCUSION	41
----------------------	----

CAPITULO 6 CONCLUSIONES	45
-------------------------	----

CAPITULO 7 REFERENCIAS	46
------------------------	----

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructuras químicas de los compuestos de <i>Amphipterygium adstringens</i>	6
Figura 2. Estructuras químicas de triterpenos.	8
Figura 3. Esquema de la cascada de apoptosis	12
Figura 4. Esquema de la diferencia entre necrosis y apoptosis	13
Figura 5. Mecanismos apoptóticos	15
Figura 6. Imagen de una célula en apoptosis utilizando ensayo cometa	22
Figura 7. Imagen de una célula con daño genotóxico utilizando ensayo cometa	23
Figura 8. Estructura del Peróxido de Hidrógeno	24
Figura 9. Mecanismo de daño al ADN producido por radicales libres	26
Figura 10. Gráfico de la viabilidad celular en sangre periférica de ratón utilizando ensayo cometa	36
Figura 11. Gráfico de los promedios de la relación longitud/diámetro utilizando el ensayo cometa	38
Figura 12. Gráfico frecuencia de cometas en la relación longitud diámetro con el ensayo cometa	39
Figura 13. Célula apoptótica originada de la combinación de peróxido de hidrógeno y el extracto de cuachalalate utilizando ensayo cometa	40

## ABREVIATURAS

- ADN. Ácido Desoxiribonucleico  
ADP. Adenosindifosfato  
ATP. Adenosintrifosfato  
DL<sub>50</sub>.- Doisis Letal 50  
DMSO.-Dimetilsulfóxido  
EPC. Eritrocitos policromáticos  
EPCM. Eritrocitos policromáticos micronucleados  
G1.- Primera fase del ciclo celular  
G2.- segunda fase del ciclo celular  
H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.- Peróxido de Hidrógeno  
IFF. Ifosfamida  
MN. Micronúcleos  
PS. Fosfatidilserina  
SNC. Sistema Nervioso Central  
TNF. Factor de necrosis tumoral  
TNFR. Receptor del factor de necrosis tumoral  
UV.- ultra violeta

## RESUMEN

El objetivo de la presente investigación es probar la hipótesis de que la acción anticancerígeno del cuachalalate se ejerce a través de la inducción de apoptosis. Para tal fin se eligió la técnica de electroforesis unicelular en gel de agarosa (ensayo cometa) ya que este ensayo de genotoxicidad evalúa la fragmentación del ADN, proceso característico del fenómeno apoptótico. Se utilizaron ratones machos de la cepa CD1 que se distribuyeron en cuatro lotes de cinco animales cada uno. Al primer lote, se administró vía intraperitoneal 500 mg/Kg de peróxido de hidrógeno como sustancia inductora de daño al ADN y causante del efecto apoptótico; el segundo lote recibió la misma dosis de peróxido de hidrógeno pero fue administrado a los 30 minutos posteriores con un extracto hexánico de cuachalalate vía oral a dosis de 1000 mg/Kg. Se contó además con un testigo negativo que recibió el vehículo del extracto (aceite de maíz) y por último el lote cuatro que recibió sólo el extracto de cuachalalate. A las 24 horas se tomó una muestra de sangre periférica de la cola de cada animal para la realización del ensayo de electroforesis unicelular en gel de agarosa; el cual consistió en preparar una suspensión celular en agarosa de bajo punto de fusión y colocarla en portaobjetos esmerilados previamente embebidos en agarosa normal. Estas preparaciones se sumergieron en solución de lisis ( Tris, NaOH, DMSO, Triton x-100) durante 24 horas término en el cual se dejaron en reposo durante 20 min. (unwinding) en la solución de electroforesis para posteriormente la realización de ésta bajo las siguientes condiciones 25 min., 25 V y 300 mA. Después de la neutralización las muestras se tiñeron con bromuro de etidio. El daño al ADN se evaluó en 130 células por cada ratón midiendo el diámetro celular y la longitud del cometa. Además se determinó la viabilidad celular con azul de Tripán de cada una de las preparaciones.

Los resultados de la viabilidad mostraron que no hubo diferencia estadística significativa entre los lotes con respecto al control negativo, con excepción del lote de animales que recibieron la combinación de sustancias, ya que la viabilidad resultó ser menor. Dicho efecto indica que existe un efecto

sinérgico citotóxico entre el peróxido de hidrógeno y el extracto de cuachalalate. En relación al efecto de inhibición del daño al ADN inducido por el peróxido de hidrógeno, el extracto de cuachalalate mostró una ligera acción antígenotóxica (14.3%) debido quizá a que el daño producido por el peróxido fue muy leve. Además se observó que sólo en el grupo tratado con la combinación se presentaron cometas de tipo apoptótico, que aunque estuvieron en porcentaje muy bajo (2.3%) hacen que no se descarte la posibilidad de que este mecanismo este implicado en la acción anticancerígena del cuachalalate.

## CAPITULO I INTRODUCCION

### 1.1 HERBOLARIA

Desde la más remota antigüedad, los hombres han utilizado las plantas como remedio para sus dolencias. Todas las civilizaciones se han valido de ellas para aliviar el sufrimiento y, en muchos casos, para curar enfermedades.

La herbolaria, como se conoce a la práctica terapéutica que utiliza plantas medicinales tiene gran arraigo en nuestro país. Las plantas medicinales constituyen un recurso muy conocido y accesible para grandes poblaciones. La Organización Mundial de la Salud ha reconocido el valor de esta práctica terapéutica y otorga gran importancia para la salud pública ( Betancourt, 2001).

La antigua fitoterapia, renovada por la ciencia moderna, conserva, hoy como ayer, su poder curativo, sobre todo en afecciones crónicas, en enfermedades degenerativas y en numerosas enfermedades metabólicas provocadas por el estilo de vida que nos impone la sociedad moderna.

Dentro de una planta pueden coexistir varios principios activos que pueden tener acción distinta a la que tendrían de manera separada. Entre estos componentes existen interacciones que producen potenciación o antagonismo, que da como resultado una acción conjunta.

Las moléculas que guardan estos principios activos al entrar en contacto con otras moléculas de un organismo, mediante el desplazamiento de iones energéticos, producen reacciones en su comportamiento químico, lo que consiste en una reacción bioquímica a nivel subatómico y microcelular pero con efectos para todo el metabolismo.

En efecto: los alcaloides, los glucósidos y otras biomoléculas actúan sobre las grandes funciones del organismo: la circulación, la respiración, etc., o bien, sobre el sistema nervioso y su acción en general en todo el organismo.

Además de sus biomoléculas y compuestos energéticos, las plantas contienen sales minerales que también ejercen una acción energética, y más activa que si se emplearan las mismas sales obtenidas por procedimientos químicos.

Esa diferente acción, se debe a que los iones de esas sales se encuentran en la planta viva en estados coloidales, con consistencia gelatinosa y cargas eléctricas que provocan equilibrios fácilmente dissociables, que al ser introducidos en otro organismo reaccionan de una manera semejante a la de los fermentos, es decir, no sólo por acción química sino biológica, son "moléculas vivas" (Fitoterapia, 2001).

Por otro lado, algunos de las especies vegetales se han utilizado en el tratamiento del cáncer por que algunas producen sustancias antimitóticas capaces de detener el crecimiento de tumores malignos. Entre las plantas capaces de detener un efecto anticancerígeno están: la zanahoria, ya que tienen una cantidad elevada de caroteno, este es un antioxidante ya que es un precursor de la vitamina A, es capaz de ayudar en la inmunidad celular, lo cual hace a las células más resistentes a la formación de tumores, además es un agente anti-radicales libres siendo útil en el tratamiento de diferentes tipos de cánceres, otra propiedad es la de protector del organismo del daño producido por rayos ultravioleta.

Otra planta es el ajo, cuyo principio activo es la alicina, y secundariamente contiene vitamina A, la cual ayuda a la prevención del cáncer de estómago; la cebolla, colabora a prevenir el cáncer del intestino, ya que regula la flora intestinal y evita los procesos de putrefacción. La col, la cual contiene caroteno que es preventivo del cáncer; la equinacea posee propiedades inmunoestimulantes aumentando las defensas inespecíficas y activando la producción de leucocitos (Plantas que curan, 2000).

El valor de las plantas medicinales está dada por sus componentes químicos, generalmente sus metabolitos secundarios que producen diversos

efectos fisiológicos. Los remedios a base de plantas medicinales presentan una ventaja extra con respecto a los tratamientos químicos. Los principios activos en las plantas se encuentran equilibrados biológicamente por la presencia de sustancias complementarias, que en forma general, no se acumulan en el organismo, y los efectos secundarios son limitados ( Plantas que curan, 2000).

Actualmente sabemos con exactitud la composición de algunas plantas de modo que podemos utilizarlas de manera racional. Sin embargo, solo se ha estudiado el 5%. Un ejemplo de ellas son: el ginseng que es un estimulante del sistema nervioso central (SNC) tiene acción antiestrés, tónico cardíaco; la manzanilla, esta tiene acción analgésica; la valeriana, tiene acción tranquilizante e hipnótica; el jengibre, que es un antiulceroso, estimulante de la digestión, por mencionar algunas. El conocimiento de las sustancias activas de las plantas y el resultado que proporcionan a la investigación farmacéutica y clínica permiten deducir sus aplicaciones medicinales.

Las propiedades de las plantas no solo son curativas sino que una de las grandes virtudes que poseen es la capacidad de regular los procesos vitales y prevenir enfermedades. El buen uso de las plantas medicinales dentro de un conjunto de hábitos de vida sana, puede evitar que las debilidades de nuestro organismo y la predisposición a padecer ciertas dolencias evolucionen hasta convertirse en enfermedades declaradas (Herbolaria, 2002).

## 1.2 CUACHALALATE

En México *Amphipterygium adstringens* es conocida como: cuachalalate, cuachalala, chalate. El nombre de cuachalalate proviene del náhuatl *cuachalalat* que significa árbol de la chachalaca que hace referencia a la chachalaca, un ave de nombre científico *Ortalis poliocephala* (Álvarez, 1998).

*Amphipterygium adstringens* es un árbol dióico de aproximadamente 5-10 metros de altura y 40 cm de diámetro, con el tronco torcido, de corteza color moreno grisáceo o gris plomizo con grandes escamas, con hojas expuestas, oblongas u oblongo-lanceoladas de 6 a 15 cm, agrupadas en las puntas de las ramas en un número de 3 a 5, en el haz son de color verde opaco y en el envés verde grisáceo. Este árbol se localiza en el Pacífico desde Nayarit hasta Oaxaca y Puebla, Morelos y el Estado de México. (Martínez, 1991).

Del árbol del cuachalalate se utiliza principalmente la corteza, se realizan infusiones acuosas o metanólicas principalmente. La gente le atribuye un gran número de propiedades curativas desde la época prehispánica como son: el tratamiento de úlceras, dolor de muelas, inflamación de riñón, granos, várices, úlceras varicosas, calentura, paludismo, caída de ovarios y matriz, tiene efecto analgésico contra el dolor de espalda, cabeza, cintura y además es antidiabético (Betancourt, 2001). Pero, no fue sino hasta la década de los años 60 que se inician las investigaciones formales sobre sus efectos terapéuticos.

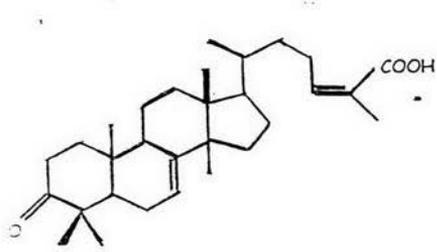
En 1962 González y col. estudiaron la posible acción antitumoral del cuachalalate al someter a ratones con adenocarcinoma mamario a tratamientos con extractos metanólicos, donde se encontró la inhibición del adenocarcinoma hasta en un 90 %.

En 1999 Olivera y col. prueban el efecto antiinflamatorio al usar el ácido  $\alpha$ -hidroximasticadienónico en diferentes modelos. El valor máximo del efecto se encuentra 3 hrs después de la administración de 10 mg/Kg al registrarse un 93% de inhibición de edema gástrico.

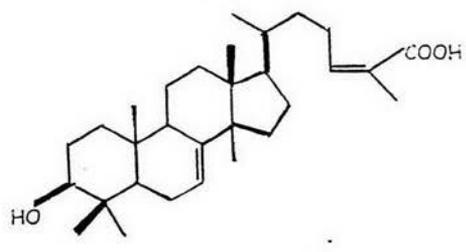
En 2001 Fernández y Navarrete evalúan la acción cicatrizante de la corteza, donde observa una recuperación del tejido de un 80% de tal manera que el cuachalate puede utilizarse con fines estéticos pues no deja cicatriz en el tejido, aún cuando no se aumenta la cicatrización.

Estudios realizados por Navarrete en 1982 permitieron el aislamiento y caracterización de dos principales activos: el ácido  $3\alpha$ -dihroximasticadienónico y el ácido masticadienónico. La investigación consistió en realizar extracciones con hexano y acetona a reflujo, a los productos obtenidos se les realizaron cromatografía y su identificación fue por medio de resonancia magnética nuclear, infrarrojo y espectrometría de masas.

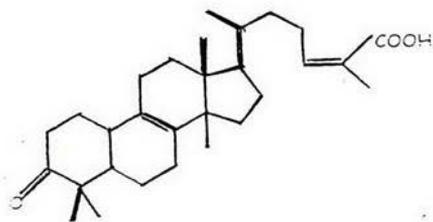
Con estos descubrimientos se han realizado investigaciones sobre la fitoquímica de la planta, donde se han identificado el  $3\alpha$  y 3-epi-masticadienónico, isomasticadienónico y epi-oleanólico; compuestos fenólicos, ácido 6-heptadecilsalicílico, 6-nonadecilsalicílico y 6-penadecilsalicílico; y el esteroide  $\beta$ -sitosterol. Además se han aislado los triterpenos: ácido instiopolinásico (Domínguez y col., 1983), aleanólico, masticadienónico,  $3\alpha$  masticadienónico además de una mezcla de ácidos anacárdicos ( Navarrete, 1982). Figura 1. En las hojas se han identificado el ácido cuachalalílico. Además de fenoles de cadena larga descubiertos por Mata y col, en 1991.



— Ácido masticadienónico



Ácido 3 α-hidroximasticadienónico



Ácido isomasticadienónico

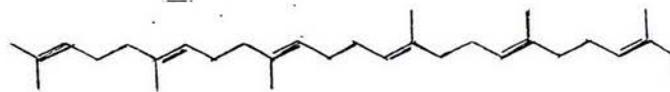
Figura 1. Estructuras químicas de los compuestos de *Amphiptherygium adstringens* (Rosas, 2000).

Los componentes principales de la corteza son el ácido masticadienónico y en segundo término el ácido  $\alpha$ -hidroximasticadienónico, cabe mencionar, que la cantidad de los compuestos depende del sexo de la planta presentándose una mayor proporción en plantas femeninas que en las masculinas, así mismo estos compuestos dependen de la época del año en que se cosecha habiendo una mayor concentración de ácido masticadienónico en el mes de febrero y ácido  $\alpha$ -hidroximasticadienónico se presenta en mayor concentración en noviembre mientras que la mezcla de estos ácidos tiene su mejor cantidad en el mes de febrero ( Olivera y col., 1999 ).

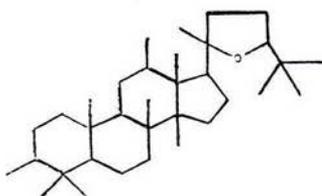
Los triterpenoides son compuestos (ésteres libres, glucósidos) formados por la unión de 6 unidades de isopropeno. Los triterpenoides naturales tienen 30 átomos de carbono y una estructura que deriva de las 6 unidades de isopropeno.

Los triterpenos de *Amphipterygium adstringens* son tetracíclicos los cuales se dividen en subgrupos según las variaciones de su esqueleto de los principales podemos mencionar los siguientes: Damarano-Eufano, Escualeno, Fusidano-Lanostano ( Barton y Seoane, 1956). Figura 2

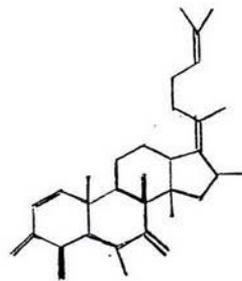
El efecto anticancerígeno del cuachalalate se le atribuye a una saponina del tipo esterooidal denominada sarsagenina. González y colaboradores en 1962 encontraron a dicha saponina en la corteza del cuachalalate, sugiriendo el efecto anticarcinógeno, sin embargo, en la actualidad se ha demostrado que hay un error en la identificación donde se descubrió que se confunde a la saponina con un triterpeno (Olivera y col., 1999).



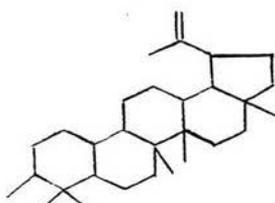
Escualeno



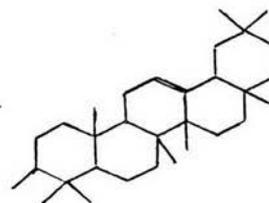
Damarano-Eufano



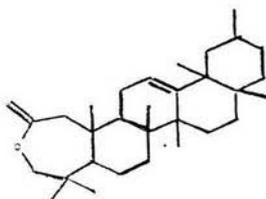
Fusidano-Lanostano



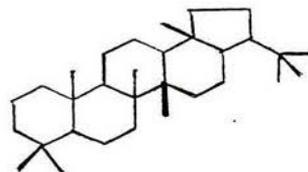
Lupano



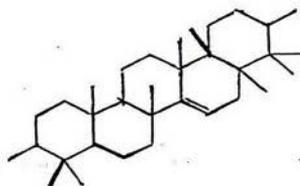
Oleanano



Ursano



Hopano



Serratano

Figura 2. Estructuras básicas de los triterpenos (Rosas, 2000 ).

Al estar presentes como componentes mayoritarios en los extractos de cuachalalate , los ácidos másticos son algunos de los principales candidatos para estudiar como las sustancias anticancerígenas presentes en la corteza del cuachalalate.

Estos hallazgos fueron el motivo por el cual nuestro laboratorio realizó el primer protocolo para evaluar la acción antígenotóxica del cuachalalate en contra del daño citogenético producido por un agente alquilante del ADN como lo es la ifosfamida (IFF) (Martínez y Flores, 2003). En dicho estudio se utilizaron ratones que fueron tratados con ifosfamida a dosis de 50 mg/Kg y posteriormente recibieron por vía oral el extracto de cuachalalate a las dosis de 500, 1000 y 1500 mg/Kg. Se contó además con los lotes control del mutágeno y del extracto solo. Se tomaron muestras de sangre de la cola de cada uno de los ratones a las 0, 24, 48 y 72 hrs después de la administración y se realizaron los frotis y se determinaron la frecuencia de eritrocitos policromáticos micronucleados (EPCM) de un total de 1000 EPC. El número de micronúcleos (MN) inducidos por la ifosfamida se consideró como el 100% de clastogenicidad, partiendo de este hecho, se determinó que el extracto produjo una inhibición de MN hasta un 90% con la dosis más alta indicando con esto una acción genoprotectora. Por otro lado, la citotoxicidad que fue evaluada con el índice de EPC por 1000 eritrocitos, mostró un efecto no citotóxico; pero en combinación con el mutágeno se presenta un efecto sinérgico que se refleja en el hecho que la citotoxicidad es mayor que la observada con la ifosfamida sola.

De aquí surgen tres hipótesis para la explicación de este efecto:

- \* La primera es que el extracto induzca una reparación, y por tanto, la célula ocupa tiempo en repararse y el proceso de división celular se ve retrasado y por eso se observan pocas células micronucleadas y disminuyen los EPC.
  
- \* La segunda, puede ser que el extracto actúe sobre la biotransformación de la ifosfamida, haciendo más rápida su farmacocinética, así que los metabolitos que son la forma activa del fármaco actuarían de forma más rápida produciendo un

efecto citotóxico más rápido y pasajero, esto explicaría por que el número de micronúcleos está disminuido ya que al pasar rápidamente no alcanza a dañar a la célula, pero no explicaría la disminución de EPC.

- \* La tercera es que exista un mecanismo por el cual, el cuachalalate induzca a las células dañadas a una muerte celular programada o apoptosis.

### 1.3 ANTECEDENTES Y DEFINICION DE APOPTOSIS

La apoptosis es un proceso intrínseco que conduce al "suicidio" celular, manteniendo la homeostasis tisular, eliminando células dañadas a través de un conjunto de modificaciones morfológicas y químicas bien definidas (Lodish y Berk, 2001)

La apoptosis es un fenómeno biológico fundamental, permanente, dinámico e interactivo, cuya función es necesaria para evitar la sobreproducción celular. Es un proceso ordenado y "silencioso" que no produce reacción tisular y por ello difícil de captar (Tamayo, 1997).

La apoptosis puede estar frenada, en equilibrio o estimulada. Por ejemplo, está frenada durante el desarrollo de espermatogonias, en los pliegues intestinales, durante la lactancia en el período preparatorio cuando el tejido mamario aumenta la masa muscular. Está estimulada cuando existen células envejecidas, mutadas, neoplásicas o no neoplásicas, alteradas por tóxicos y las que están en procesos de metamorfosis o atresia (Yun-Bol y, col. 1997).

En la apoptosis el proceso afecta a determinadas células, no necesariamente contiguas y no a todas en un área tisular. La membrana celular no se destruye, lo que impide el escape al espacio extracelular de su contenido, resultando un proceso silencioso, sin inflamación. En el citoplasma se produce granulación fina, con conservación de algunos organelos, en especial las mitocondrias que tienen un papel interactivo importante.

A nivel celular la cromatina se condensa agrupada en varios sectores formando cuerpos apoptóticos. La membrana celular se recoge sobre las eminencias globuliformes que forman los elementos deteriorados del citoplasma y núcleo. Finalmente, los fagocitos captan a la célula en su totalidad impidiendo que se produzca alarma en el resto del tejido (Olive, 1995)

La apoptosis es una forma de muerte celular programada, en la que el núcleo sufre condensación y fragmentación, la membrana plasmática muestra vesiculación y gemación y la célula muerta es fagocitada sin liberar su contenido, esto contrasta con la necrosis, en que las membrana nuclear y plasmática se rompen y liberan su contenido celular, siendo esto responsable de una reacción inflamatoria local ( Abbas, 2000 ).Figura 3 y 4

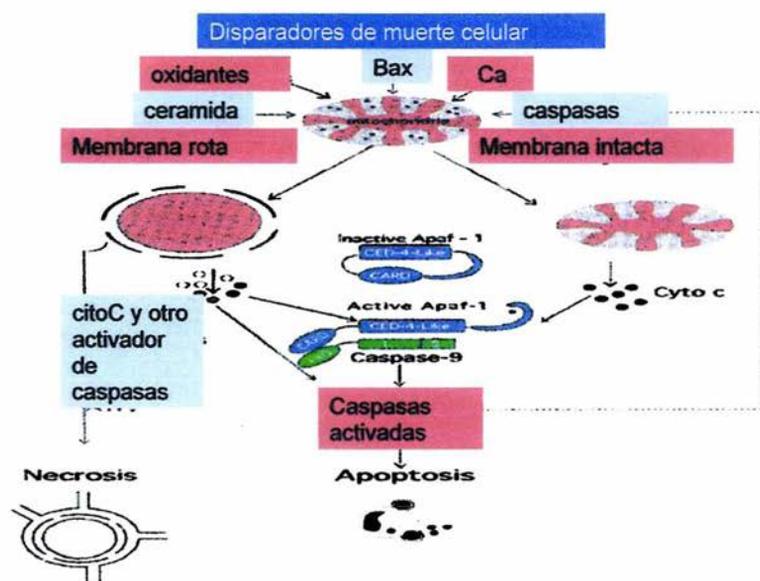


Figura 3 Esquema de la cascada de apoptosis (Apoptosis, 2003 )

Los disparadores de la muerte celular programada pueden ser diferentes sustancias que atacan a las células produciendo dos mecanismos de defensa: si la membrana celular se hincha y sufre rompimiento desencadena una serie de procesos moleculares que dan origen a las necrosis; en cambio si la membrana queda intacta se activa la cascada de caspasas produciendo el fenómeno de apoptosis.

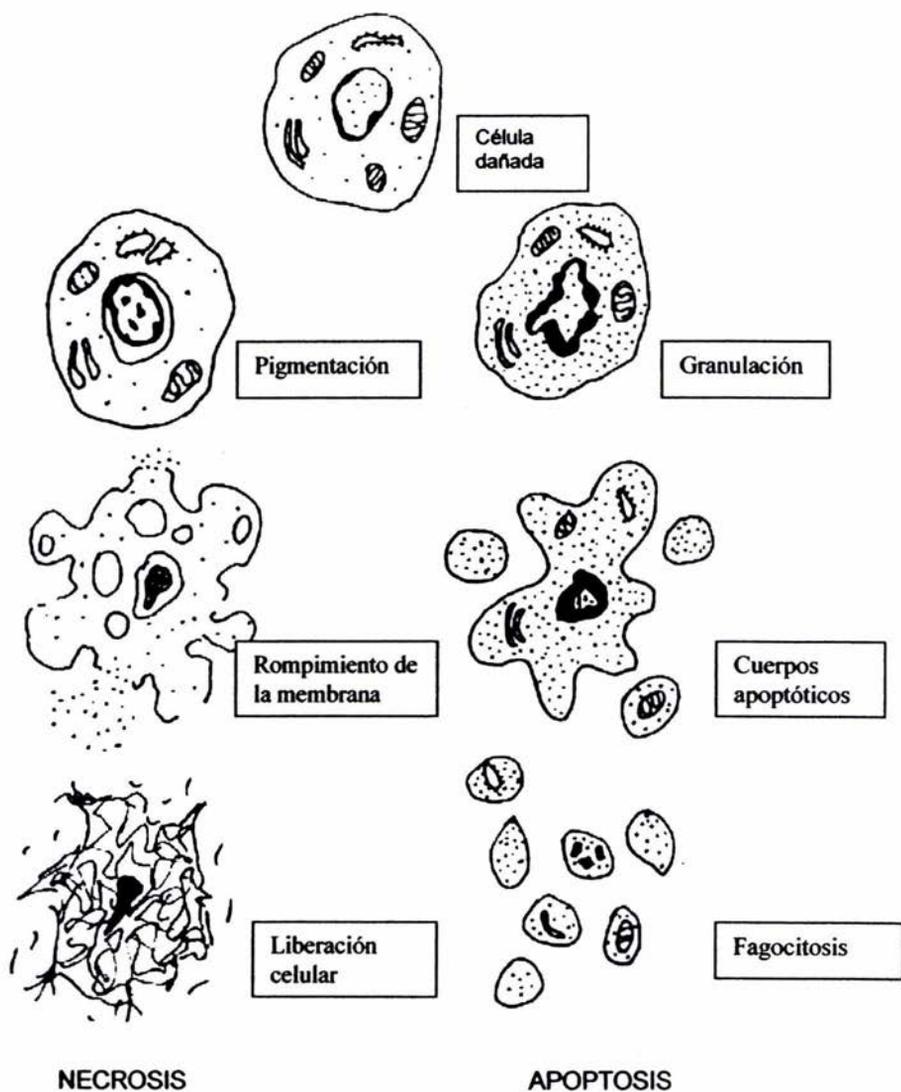


Figura 4. Esquema de la diferencia entre apoptosis y necrosis. ( Abbas, 2000 )

Dado que la apoptosis actúa como oponente de la mitosis, es muy importante su relación con el ciclo celular. En el ciclo celular hay cuatro fases: mitosis (M), fase de control celular (G1), síntesis de ADN (S) y fase de control (G2). La apoptosis puede iniciarse en el tercio final de G1 para impedir que la célula dañada ingrese a la fase de síntesis de manera que las mutaciones no se produzcan durante la réplica de DNA ingresando así a la especie y en la fase de G2 para impedir que las células que no hayan llegado a la madurez entren en mitosis.

En el control del ciclo celular tienen un papel muy importante dos grupos de proteínas, la cdk (quinasas dependientes de ciclinas) sólo se activan cuando se unen a ciclinas. Las ciclinas A y B se sintetizan por genes específicos durante la interfase y después son degradadas por enzimas proteolíticas al finalizar cada mitosis. La síntesis de estos complejos es constante por que son inestables. De ahí que el nivel de ellos varía de acuerdo al momento evolutivo de las fases a que están asignadas. Así en el avance de la fase G1 a la de síntesis actúa la ciclina D asociada a las kinasas ciclinodependientes 2, 4 y 6 (cdk 2, 4, 6). En la segunda mitad de G1 aumenta la presencia de ciclina E con la kinasa ciclinodependiente 2. En la fase de síntesis actúa la ciclina A cdk 2 y en la fase G2, la ciclina B con cdk 2. En la fase G1 se han podido determinar dos puntos importantes: G0 (en la mitad de la fase) donde el ciclo puede detenerse, la célula bloquea su crecimiento; pero se mantiene metabólicamente activa y un punto de restricción en que se puede detener el ciclo para corregir defectos celulares ( en especial en su ADN ), lo que si no se consigue induce el mecanismo de muerte celular. En la fase G2 también existen elementos de detección de inmadurez celular que inducen la apoptosis cuando la célula no está capacitada para entrar a mitosis.

### 1.3.1 Biología molecular de la Apoptosis

En su modelo más simple, las etapas de la Apoptosis pueden ser consideradas como: iniciación, regulación genética y mecanismos efectores.

Figura 5

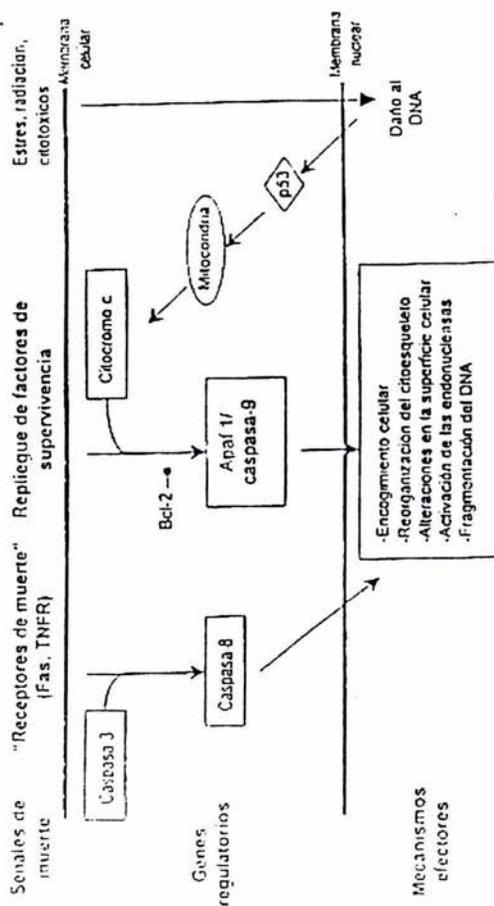


Figura. 5 Mecanismos Apopticos (Renehan y Col 2001)

Continuamente una célula esta expuesta a múltiples activadores opuestos de muerte y supervivencia. A la fecha se conocen algunos de los eventos moleculares que controlan este balance de señales. Se conocen también múltiples activadores de la apoptosis, tales como la supresión de factores de crecimiento ( IL-1 ), daño al DNA ( radiaciones  $\gamma$ , UV, y agentes genotóxicos en general ), la unión de ligandos como FasL y el factor de necrosis tumoral ( TNF ), a sus receptores Fas y TNFR, aplicación de agentes quimioterapeúticos, etc. ( Berke, 1995 )

Aunque estos factores inician una cascada de eventos que finaliza en muerte celular por apoptosis, éstos difieren en la duración de intervalo de tiempo entre la exposición al activador y el momento de los primeros signos de apoptosis o también llamada fase de activación. La duración de esta fase depende del tipo celular, tipo del activador y condiciones de crecimiento de la célula (Martín y Green, 1995).

Los diferentes mecanismos de activación parecen converger en la activación de una cascada proteolítica que involucra un grupo de cistein-proteasas pertenecientes a la gran familia de las caspasas. En otras palabras, la mayoría de los cambios visibles que caracterizan a la muerte celular programada son causados principalmente por un grupo de caspasas. (Martín y Green, 1995).

La activación de caspasas origina la ruptura de proteínas celulares tal como la matriz nuclear, el citoesqueleto, y la polimerasa poli-ADP-ribosa, ya sea directamente o a través de la activación de otras proteasa celulares como las calpains o proteosomas (Grim y col., 1996 ). Adicionalmente en esta etapa del proceso apotótico el fosfolípido fosfatidilserina ( PS ) se trasloca hacia la cara externa de la membrana celular ( van Engeland y col., 1996 ).

Se piensa que la simetría lipídica de la membrana plasmática en células viables es mantenida por las llamadas flipasas, proteínas membranales que facilitan el traslado de moléculas lipídicas de una cara de la membrana a otra. Esta actividad de traslocación ahora parece ser omnipresente y contribuye significativamente a la simetría PS en la membrana de tipos celulares nucleados y anucleados (Higgins, 1994).

Así pues, además de la actividad de las flipasa que mantienen a la PS asimétricamente en la cara interna de la membrana las células también poseen la capacidad de trasladar a la PS a al cara externa de la membrana plasmática. (Dizz y Schrott, 1996).

### **1.3.2 Métodos de detección de apoptosis**

El número de métodos diseñados para identificar, cuantificar y caracterizar el fenómeno apoptótico también va en aumento, dichos ensayos pueden medir uno o varios eventos apoptóticos (Wyllie y col., 1998)

- ❖ Fragmentación del DNA en poblaciones o en células individuales, en las cuales el DNA apoptótico se rompe en piezas o partes de diferente longitud. Ejemplo: ensayo cometa, marca o tinción enzimática TUNEL.
- ❖ Alteraciones en la membrana citoplasmática. Ejemplos: tinción con anexina V. En las células apoptóticas la fosfatidilserina se traslada del lado intracelular a lado extracelular de la membrana (cambios en la simetría de la membrana) y por otra parte la pérdida de integridad de la misma da lugar a cambios en su permeabilidad.
- ❖ Actividad de proteasas: Miden la actividad de las caspasas. Ejemplo: catepsinas.
- ❖ Cambios en la mitocondria: liberación del citocromo C y liberación del factor inductor de apoptosis (AIF) de la mitocondria, medición de la

dimensión ATP: ADP, tinciones mitocondriales, cambios en el potencial membranal.

- ❖ Protección de proteínas relacionadas con la apoptosis: Ejemplos: anti-Fas, anti-Bcl-2, anti-b53, entre otros.

Dado que el interés de la presente investigación es conocer el mecanismo por el cual el cuachalalate ejerce su acción anticancerígeno, se eligió la técnica de evaluación genotóxica como lo es el ensayo de electroforesis unicelular en gel o ensayo cometa ya que es un método que evalúa la fragmentación del ADN.

#### 1.4 ENSAYO COMETA

El ensayo de electroforesis unicelular o ensayo cometa es una técnica rápida, simple y sensible para la medición y análisis de la ruptura de ADN en células de mamíferos (Olive y col., 1994 )

Las rupturas de cadena sencilla son comúnmente medidas por procedimientos a pHs altos, elusión y desenrollamiento alcalino así como la sedimentación alcalina. Lo importante es que cuando existe una ruptura de cadena sencilla puede ser detectada a pHs alcalinos, cuando se utiliza pHs neutros se pone de manifiesto rupturas de cadena doble originadas por radiaciones. Las moléculas de ADN de células eucariotas son condensadas de 50-100cm de largo a núcleos de 5-10 $\mu$ m de diámetro, las rupturas de cadena sencilla liberan el enrollamiento e inducen un relajamiento estructural del ADN que es detectado y medido por el análisis de las propiedades de sedimentación del material genético (McKelvey-Martin y col., 1993; Vrzoc y Petras, 1996 ).

Varios ensayos han sido desarrollados para medir rupturas de ADN y cada una tiene sus particulares ventajas y desventajas. EL ensayo cometa es una técnica valiosa que permite la detección de diferencias intracelulares en el daño de ADN y reparación en cualquier población celular que pueda ser obtenida de una suspensión unicelular, esto requiere de pequeñas cantidades de células (de 1 a 10000 células) y los resultados pueden ser obtenidos en un solo día ( Olive y col.,1994 )

Se ha demostrado que la sensibilidad para detectar el daño en células analizadas en el ensayo cometa es comparable a la sensibilidad de otros métodos que miden el daño promedio a la población celular (McKelvey-Martin y col.,1993 ).

Los investigadores Rydberg y Johanson realizaron la primera cuantificación del daño al ADN en células únicas, embebidas en agarosa sobre un portaobjetos y lisado bajo condiciones alcalinas con posterior neutralización, las células fueron teñidas con naranja de acridina y la extensión del daño del ADN fue cuantificado por la proporción de una tonalidad verde que indicaba ADN de cadena doble a una tonalidad roja indicativo de ADN de cadena sencilla con fluorescencia usando un fotómetro. En 1984, Ostling y Johanson perfeccionaron la sensibilidad para detectar daño en el ADN en células únicas por el desarrollo de una técnica electroforética en microgel. Las células fueron embebidas en agarosa sobre un portaobjetos y fueron lisadas por detergentes y sales a altas concentraciones. También la electroforesis fue realizada bajo condiciones neutras a 5 V/cm. Los núcleos teñidos con naranja de acridina tenían una cauda más fluorescente que correspondía al daño al ADN provocado por las dosis de rayos X. Ostling y Johanson detectan que el ADN que sale del núcleo puede ser detectado en dosis tan bajas como 5 Gy que ponen de manifiesto un daño correspondiente a 2010 rupturas dobles por célula.

La técnica adaptada de electroforesis unicelular es la de Singh y col, (1998) en la cual el procedimiento anterior es modificado para realizar la electroforesis a pHs altos, de esta manera los sitios alcali-lábiles y los fragmentos rotos son detectados con la tinción con bromuro de etidio, se observa que en los núcleos de células dañadas la extensión del ADN es mayor y tiene una migración hacia el ánodo. Cada célula dañada tiene apariencia de un cometa con una fluorescencia brillante en la cabeza y una cauda en la cual el largo y la fluorescencia están relacionadas con las rupturas de ADN inducido por el agente en prueba. Se puede apreciar que la cauda consiste de una serie de fragmentos en un alto orden estructural. Las células sin daño aparecen como núcleos intactos (cabeza del cometa) sin cauda. (McKelvey-Martin y col., 1993).

Desde la publicación de Singh y col ( 1998 ) donde describieron el ensayo de electroforesis unicelular alcalino, varios laboratorios han realizado esta técnica en su forma original o con algunas modificaciones, pero

básicamente es: preparación de portaobjetos, se coloca una base de agarosa de punto de fusión normal, para posteriormente colocar una capa de agarosa de bajo punto de fusión con una suspensión celular y finalmente una tercera capa de agarosa de bajo punto de fusión, estas láminas son colocadas en una solución de lisis para posteriormente correr una electroforesis bajo las siguientes condiciones  $\text{pH} \geq 13$  a 25 V y 300 mA durante 30 minutos, después se neutralizan para finalmente ser teñidas con bromuro de etidio y ser analizadas al microscopio de fluorescencia (McKelvey-Martin y col., 1993).

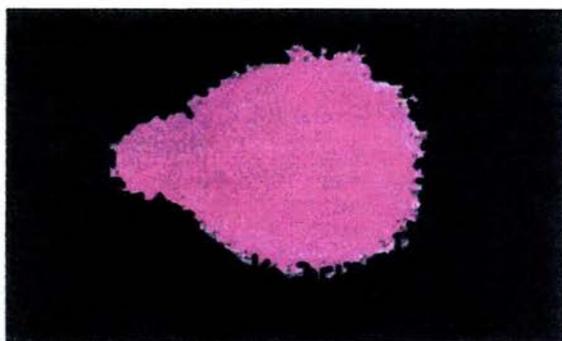
Algunos investigadores, sin embargo, han encontrado que el largo de la cauda es constante sobre un rango de frecuencias de rupturas de  $1-14 \times 10^{10}$  Daltons, pero que la intensidad de la fluorescencia en la cauda incrementa marcadamente con el incremento en la frecuencia de rupturas.

Los tipos de mutación efectuada por los agentes de prueba serán mostrados dependiendo el pH de la electroforesis, a pH de 12.6 no pueden ser detectados sitios alcali-lábiles, en este estudio utilizaremos pH de 13 debido a que el ensayo cometa es usado para la detección de mutágenos que inducen rupturas de cadena sencilla, sitios alcali-lábiles o entrecruzamientos de ADN. Los resultados demuestran que las condiciones alcalinas son un importante factor para detectar el efecto genotóxico de los químicos ( Youchi y col., 1997) .

En la presentación y análisis de los datos del ensayo cometa han sido debatidas dos cuestiones: la primera ¿cuál es la mejor forma de medir la cauda del ADN fragmentado? Y la segunda ¿se puede distinguir la cauda que emana una célula muerta de una cauda que muestra una célula donde el ADN ha sido dañado directamente por un genotóxico?. Para la primera pregunta se sabe que la mejor forma de medir el daño es obteniendo el momentum de la cauda y para la segunda pregunta se ha encontrada en la bibliografía que las células muertas no muestran cometa debido a que existe una previa degradación de ADN por lisosomas (Ashby, 1995).

Este ensayo cometa ha sido usado en estudios *in vitro* e *in vivo* para evaluar daño y reparación al ADN inducido, por varios agentes en diversas células de mamíferos (Olive y col., 1994). Se han estudiado diferentes tipos de sustancias mutagénicas con el ensayo cometa, un ejemplo de ello es el metilmetanosulfonato y la dietilnitrosamina donde la producción de células apoptóticas dependen del tiempo de exposición al mutágeno y el órgano estudiado (Miyamae y col., 1998).

Si las rupturas cromosómicas son debidas a un proceso apoptótico, los cometas obtenidos mostrarán una imagen característica de dicho evento. Figura 6, de lo contrario si el daño es genotóxico los cometas se presentan como se muestra en la figura 7.



**Figura 6.** Imagen de una célula en apoptosis utilizando ensayo cometa

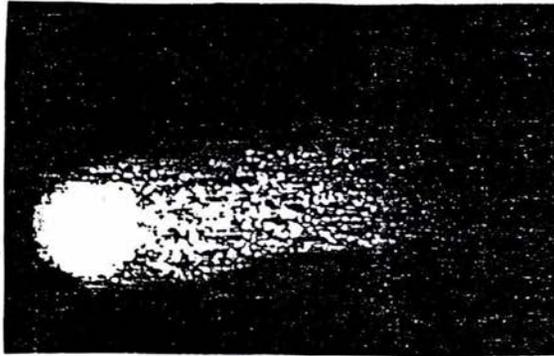


Figura 7. Imagen de una célula con daño genotóxico utilizando el ensayo cometa

## 1.5 PEROXIDO DE HIDRÓGENO

Para evaluar la acción antígenotóxica del extracto de cuachalalate se requiere de una sustancia reto, ésta debe ser un agente que produzca fragmentación de ADN y que haya sido probada anteriormente como agente apoptótico. Por tal razón elegimos al peróxido de hidrógeno.

El peróxido de hidrógeno tiene un peso molecular de 34.014 g/mol, es un líquido incoloro muy inestable, soluble en agua a todas las proporciones. Los cuatro átomos se encuentran enlazados covalentemente mediante una estructura no polar (Figura 8). Sus propiedades físicas son: punto de fusión de 44° C; temperatura de ebullición 150.2° C; densidad a 25° C 1.44g/cm; viscosidad a 20° C 1.245mPas; calor específico a 25° C 0.628 cal/g; constante de disociación a 20° C  $1.78 \times 10^{-12}$  con fuerza iónica de cero.

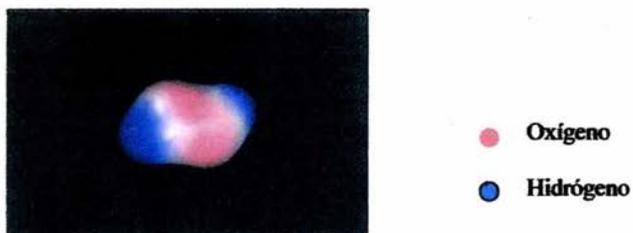


Figura 8 Estructura molecular del peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ).

El peróxido de hidrógeno puede reaccionar directamente o después de haberse disociado en radicales libres. En muchos casos el mecanismo de reacción es extremadamente complejo y puede proceder por catálisis o puede depender del medio donde se realiza la reacción (Barcelo, 1982).

El mecanismo de acción del peróxido de hidrógeno puede explicarse por medio de la formación de radicales libres. Por esta razón el peróxido de hidrógeno tiene gran capacidad antiséptica y de amplio espectro contra bacteria, hongos, virus y esporas cuando se utiliza de manera adecuada.

El peróxido de hidrógeno es uno de los compuestos químicos industriales más utilizados. Se le conocen numerosos usos industriales. Debido a su acción suave está sustituyendo al cloro en el blanqueo de textiles, además se utiliza en el blanqueo de pelo, seda, lino, lana, algodón, rayón, lana, gelatinas, ceras ( Kirk, 1995).

El oxígeno molecular tiene poca capacidad de oxidar otros compuestos químicos y para ello debe convertirse primero en una forma activa del oxígeno. Existen varias formas de oxígeno activo, se denominan radicales libres de oxígeno. Uno de los más importantes es el radical libre superóxido  $O_2^{\cdot-}$ , y otro es el radical peróxido en forma de peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ).

Los radicales libres son moléculas inestables que perdieron un electrón y son muy reactivas. Su misión es la de remover el electrón que les hace falta de las moléculas que están a su alrededor para obtener su estabilidad. La molécula atacada, que perdió un electrón, se convierte entonces en un radical libre y de esta manera se inicia una reacción en cadena que dañará muchas células y puede ser indefinida si los antioxidantes no intervienen (Envejecimiento, 2003).

Los radicales libres producen daño al tomar electrones de los lípidos y proteínas de la membrana celular, que entonces no podrá cumplir sus funciones como el intercambio de nutrientes y descartar los materiales de deshecho celular, haciendo imposible el proceso de regeneración y reproducción celular. En el interior de la célula, los radicales libres atacan el DNA impidiendo a la célula su reproducción. Figura 9

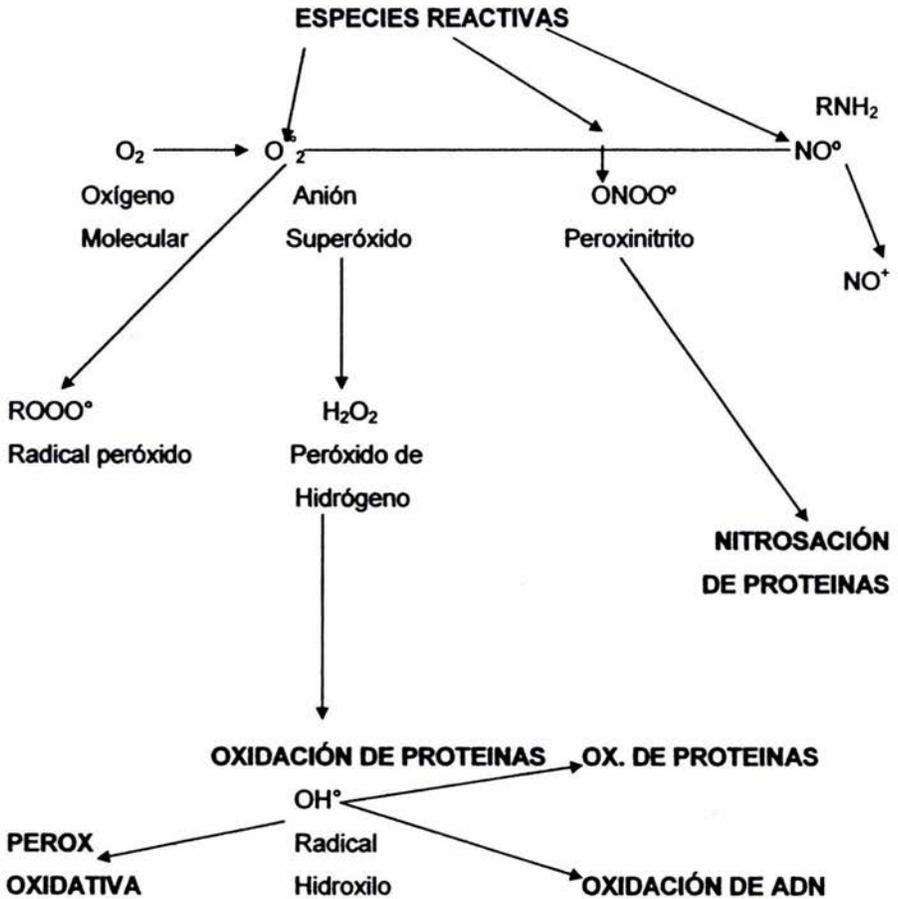


Figura 9 Mecanismos de daño al ADN producido por radicales libres(Envejecimiento,2003)

Cualquier molécula que se encuentre en su vecindad inmediata se verá afectada y se transformará, a su vez, en un radical libre, lo que desata una reacción en cadena. Cuando tales especies activas se producen en la membrana celular, predomina la reacción en cadena de la lipoperoxidación, proceso por el cual se oxidan, es decir, ceden sus electrones a los radicales las moléculas de ácidos grasos, principales componentes de las membranas celulares.

El daño provocado al ADN por los radicales libres conduce a mutaciones y pérdidas en el control celular. EL daño que se observa en el material genético es la alteración de bases, cortes de una hebra, intercambio de cromátidas hermanas y entrecruzamiento de ADN proteínas.

Las especies reactivas del oxígeno reaccionan con el ADN, oxidando el esqueleto azúcar-fosfato y las bases. La reacción con los azúcares conduce a la fragmentación del azúcar, a la pérdida de una base con parte del residuo del azúcar que aún permanece unido y al corte de la cadena (Larousse, 1998).

El efecto oxidativo que se produce sobre las bases nitrogenadas del ADN tiene por consecuencia que: la guanina se oxide a 8-hidroxiguanina; la adenina a 8-hidrox adenina y la timina se transforma a timina glicol (Wu y col., 2003). Estos estados químicamente modificados podrían traer como resultado el apareamiento erróneo de las bases y por lo tanto eventos mutacionales.

No se han realizado estudios del peróxido de hidrógeno como agente genotóxico o apoptótico in vivo; sin embargo se conoce que su principal acción tóxica y genotóxica es a través de la producción de radicales libres. Se ha reportado también que la DL<sub>50</sub> en rata es de 2.5 g/Kg (Schumb y col., 2000)

Las investigaciones del peróxido de hidrógeno donde se documenta su acción tóxica y genotóxica se han realizado en sistemas in vitro. Algunos de los antecedentes son los estudios realizados por Singh y col., en 1998, donde se establece la utilidad del ensayo cometa como prueba de antigenotoxicidad. En

estas investigaciones se utiliza al peróxido de hidrógeno a una concentración de 200  $\mu\text{M}$ , este estudio se realiza sobre linfocitos humanos para establecer y estandarizar un control positivo para este ensayo.

Wang y col (1997) han realizado estudios de detección de rompimiento de hebras individuales de ADN sobre cultivos de linfocitos humanos, ratones y ratas, inducidos por el peróxido de hidrógeno utilizando el ensayo cometa, en esta investigación se demuestra que la fragmentación del material genético puede ser detectada con dicha técnica y que existen diferencias en la respuesta genotóxica de cada especie.

Con la finalidad de estudiar la inducción de apoptosis, cultivos primarios de hepatocitos de ratón se expusieron a una concentración de 3  $\mu\text{M}$  de peróxido de hidrógeno; en esta investigación se observó que la viabilidad celular se redujo y se presentó la fragmentación de ADN; este fenómeno se presentó desde la primera hora y se prolongó hasta las 24 horas (Kanno y col.,2000). Estos mismos autores realizaron otras investigaciones en este sistema de hepatocitos in vitro, pero esta vez adicionando N-acetilcisteína como antioxidante antes de aplicar peróxido de hidrógeno, observando que la citotoxicidad y el daño al material genético se reduce (Kanno y col., 1999).

## **CAPITULO 2. OBJETIVOS**

### **2.1 OBJETIVO GENERAL**

Estudiar la capacidad apoptótica de un extracto de cuachalalate en sangre periférica de ratones de cepa CD1 por la técnica de ensayo cometa para evidenciar los posibles mecanismos que se llevan a cabo.

### **2.2 OBJETIVOS PARTICULARES**

- ✦ Evaluar la producción de cometas inducidos por el peróxido de hidrógeno al administrar una dosis de 500 mg/Kg a ratones CD1 para establecer un control positivo.
  
- ✦ Evaluar la producción de cometas en ratones CD1 tratados con el extracto de cuachalalate a dosis de 1000 mg/Kg para establecer el daño producido por el extracto al material genético.
  
- ✦ Determinar la frecuencia de cometas cuando se administra una combinación de peróxido de hidrógeno con un extracto de cuachalalate para establecer si existe un evento apoptótico.

## **CAPITULO 3 MATERIALES Y METODOS**

### **3.1 Material Biológico**

Se utilizaron 20 ratones de la cepa CD1 del bioterio de los laboratorios Birmex de 25 g cada de los cuales se distribuyeron en 4 lotes de 5 animales cada uno

### **3.2 MÉTODOS**

#### **3.2.1 Extracción del cuachalalate**

1.- Para la extracción de cuachalalate, se pesaron 130g de corteza que se colocaron en un matraz bola y se llevaron a reflujo con dos porciones de 500 ml de hexano durante una hora.

2.- Por decantación se reunieron las porciones de hexano y se colocaron en un matraz bola, posteriormente se eliminó el disolvente en un rotavapor. El producto se colocó en frascos viales. El disolvente residual se disolvió a vacío por un lapso de cuatro horas y se determinó el rendimiento. El producto se sometió a liofilización pero no se obtuvieron resultados favorables por lo que el extracto se utilizó tal como se obtuvo.

### 3.2.2 Identificación del producto

1.- Se procedió a la identificación del extracto realizando una cromatografía en capa fina, utilizando como fase inmóvil una placa de sílica gel y como fase móvil una solución 1:1 de hexano y acetato de etilo.

2.- Se compararon los corrimientos con los del ácido masticadienónico y 3- $\alpha$ -hidroximasticadienónico en su forma pura (Martínez y Flores, 2003)

- **Toma de la muestra**

Para realizar la prueba de ensayo cometa los ratones se dividieron en 4 lotes de cinco ratones cada uno y se les administraron los tratamientos como se menciona a continuación:

Lote 1 Aceite de maíz

Lote 2 Peróxido de hidrógeno en dosis de 500 mg / Kg.

Lote 3 Extracto de cuachalalate en dosis de 1000 mg / Kg

Lote 4 Peróxido de hidrógeno dosis 500 mg / Kg. + Extracto de cuachalalate en dosis de 1000 mg / Kg

El peróxido de hidrógeno se administró por vía intraperitoneal y media hora después se administró por vía oral el extracto disuelto en aceite de maíz.

24 hrs después de la administración de los tratamiento a cada organismo se le realizó la toma de muestra cortando la parte terminal de la cola y tomaron 15  $\mu$ l de sangre y se mezclaron con 0.01 ml de heparina contenida en tubos de eppendorf de 1 ml.

## **Viabilidad celular**

Una vez obtenida una muestra, se realizó la cuenta viable ( % de viabilidad celular), colocando 0.1 ml de la suspensión celular en un tubo de ensaye que contenía 0.9 ml de azul de tripan, se agitó, se dejó reposar 5 min. Y se cargo el hemocitómetro.

- **Ensayo cometa**

### **A. Preparación de laminillas**

1. Se preparó una cámara con solución de lisis pH 10 ( NaCl, EDTA, tris, NaOH, Triton X-100 y DMSO )
2. Se colocaron 150  $\mu$ l de agarosa normal por la parte esmerilada del portaobjetos y las laminillas se depositaron sobre paquetes congelantes.
3. Se resuspendieron 5  $\mu$ l de sangre en 75  $\mu$ l de agarosa de bajo punto de fusión 0.5 % a 37 ° C y se colocaron como capa sobre cada laminilla previamente preparada.
- 4.-Se dejó solidificar la agarosa y después se removieron los cubre objetos y se colocaron las laminillas verticalmente en la solución de lisis fría; colocando los vasos Kopplin a 4°C durante 24 hrs.

#### B.-Corrimiento de electroforesis

- Se retiraron los portaobjetos de la solución de lisis y se colocaron en la cámara de electroforesis.
- Se llenó la cámara con el buffer de electroforesis pH 13, recién preparado que cubrió los portaobjetos y se dejaron en estas condiciones durante 20 min.
- Se corrió la electroforesis durante 25 min. a 25 V y 300 mA.
- Una vez terminada la electroforesis se levantaron suavemente los portaobjetos de la cámara y se gotearon hasta cubrirlos con buffer de neutralización repitiendo este procedimiento dos veces.

#### C.-Tinción de las preparaciones

- Se adicionaron 50  $\mu$ l de bromuro de etidio y se montaron con cubre objetos.

#### D.-Evaluación del daño al ADN

- Las observaciones se realizaron usando un microscopio de fluorescencia equipado con un filtro de excitación de 515-560 nm y un filtro de barrera de 590 nm, usando el objetivo de 40 X.
- Las evaluaciones se realizaron en 130 células por cada ratón, tanto tratamiento como controles; dichas evaluaciones fueron:
  - a.) Medida del diámetro del núcleo celular.
  - b.) Medida de la longitud de la imagen celular

➤ **Análisis estadístico.**

En el análisis celular microscópico se midió la longitud y el diámetro de cada una de las 130 células por cada ratón tratado, cada uno de ellos, fueron tratados estadísticamente con la prueba de ANOVA, en la que se realizó un análisis de varianzas y la posterior comparación múltiple con  $\alpha = 0.05$  entre los promedios de los grupos experimentales.

➤ **Porcentaje de inhibición**

Se calculo de la siguiente manera:

$$100 - \% \text{ de daño genético}$$

## CAPITULO 4 RESULTADOS

### Viabilidad celular

En los tratamientos experimentales se obtuvo una viabilidad celular aceptable durante todo el proceso de exposición a cada uno de los agentes. Figura 10

Los resultados se muestran en la tabla 1 donde la viabilidad se estimó utilizando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de viabilidad} = (\text{células vivas/células muertas}) 100$$

Tabla 1. Porcentaje de la viabilidad celular de sangre periférica de ratones con los diferentes tratamientos.

	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Combinación	aceite de maíz	Extracto
	89	89	92	92
	90	89	91	93
	91	88	92	92
	90	89	91	91
	90	89	90	91
X ± D.E.	90 ± 0.707	89 ± 0.44*	91 ± 0.83	92 ± 0.83

\* Diferencia estadísticamente significativa con respecto al aceite de maíz con la prueba de ANOVA y con comparación múltiple Tuckey-Kramer  $\alpha = 0.05$

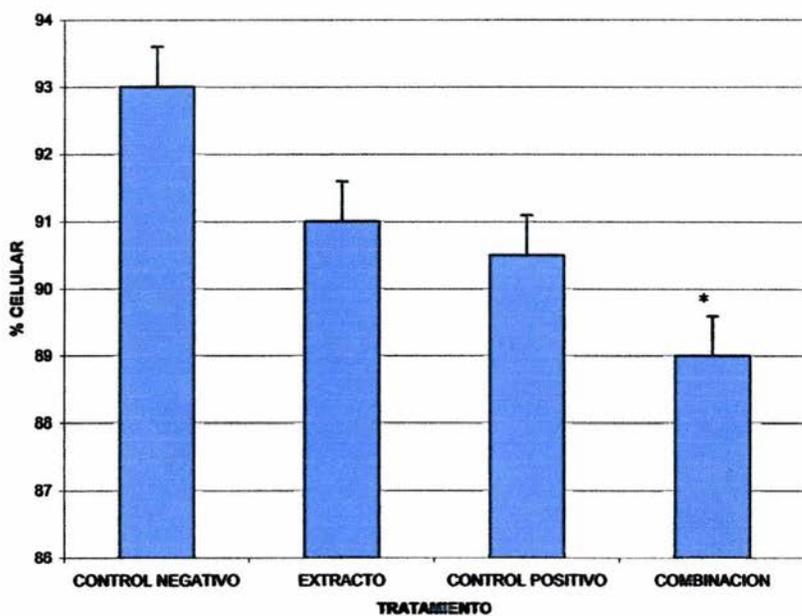


Figura 10 Gráfico de la viabilidad celular en sangre periférica de ratón con los diferentes tratamientos

\*Diferencia estadísticamente significativa Truckey-Kramer

$p < 0.001$

En la tabla 2 se observa los promedios celulares de la relación longitud / diámetro, estos resultados muestran el daño genotóxico que originan los diferentes tratamientos en los organismos. Figura 11, estos resultados se obtienen dividiendo la longitud de la célula entre el diámetro de la misma. Se encontraron un 2.3 % de células propias de apoptosis como se muestra en la figura 13.

Tabla 2. Promedio de los valores obtenidos de la relación longitud/diámetro de células de sangre periférica de ratón con los diferentes tratamientos

	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	combinación	aceite de maíz	Extracto
	1.2	1.2	1.0	1.0
	1.3	1.2	1.0	1.0
	1.3	1.2	1.0	1.0
	1.3	1.2	1.0	1.0
	1.2	1.3	1.0	1.0
X ± D.E.	1.3 ± 0.05*	1.2 ± 0.04*	1.0 ± 0	1.0 ± 0

\* Diferencia estadísticamente significativa con respecto al aceite de maíz con la prueba de ANOVA y con comparación múltiple Tuckey-Kramer  $\alpha = 0.05$

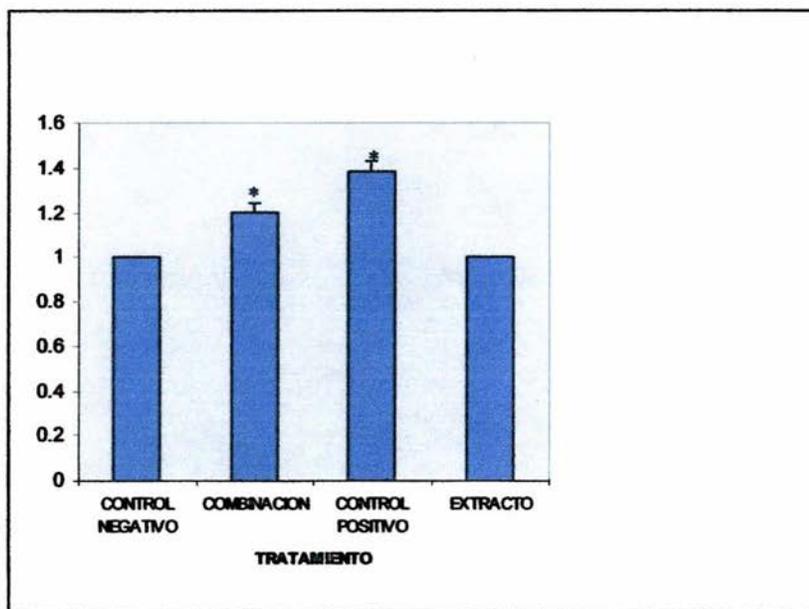


Figura 11 Gráfico de los promedios de la relación longitud/diámetro utilizando ensayo cometa

\* Diferencia estadísticamente significativa  $p < 0.001$

En la gráfica que muestra la figura 12 se observa que tanto el control negativo como el extracto tienen una población celular del 100% que se distribuye en un rango de daño al ADN de 1.0-1.10 lo que indica que las células no presentan daño genotóxico; el grupo tratado con el peróxido de hidrógeno muestra el mayor efecto genotóxico ya que un 58% de células se encuentran entre 1.11-1.30 y otro 42% de células se encuentran dentro de 1.4-1.5 longitud/diámetro. Por otro lado, aunque el valor promedio de la longitud/diámetro del lote que recibió la combinación de sustancias se diferencia del anterior por 0.1, la distribución de las células con daño al ADN es diferente ya que 76% se encuentra en 1.1-1.10 y 24% con mayor daño entre 1.4-1.5

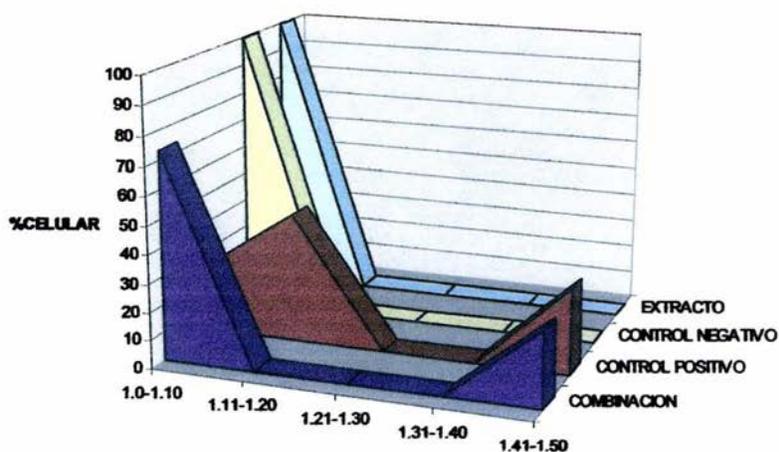


Figura 12 Gráfico de la frecuencia de cometas en la relación longitud/diámetro con el ensayo cometa



**Figura 13. Célula apoptótica originada por la combinación de peróxido de hidrógeno y el extracto de cuachalalate utilizando el ensayo cometa**

## CAPITULO 5 DISCUSION

En el presente estudio el extracto de cuachalalate por si solo no ejerce un efecto citotóxico ya que presenta un 92% de células vivas y no presenta una diferencia estadísticamente significativa con respecto al testigo negativo, el grupo tratado con el peróxido de hidrógeno tampoco presenta un efecto citotóxico al presentar un 90.5% de células vivas, estos resultados son similares a los obtenidos por Roser y col., que en 2001 demostraron que el peróxido de hidrógeno es un agente ligeramente citotóxico, pero estos resultados pueden justificarse ya que emplearon una dosis muy baja para lograr una viabilidad aceptable para la realización del ensayo cometa. Sin embargo, el grupo tratado con la combinación se presenta una tendencia citotóxica que resulta ser significativa con respecto al control negativo, esto sugiere un efecto de potenciación.

Lo mismo ocurre en el trabajo realizado por Martínez y Flores (2003) ya que al administrar un agente alquilante como mutágeno no obtuvieron resultados estadísticamente significativos con el lote testigo negativo, en relación a la frecuencia de EPC por lo cual se concluye que el extracto no es citotóxico *per se*. Así mismo, en el grupo tratado con la combinación del extracto con la ifosfamida, observaron una tendencia citotóxica, esto puede indicar un efecto sinérgico, así pues, dos agentes mutagénicos (peróxido de hidrógeno e ifosfamida) con mecanismos de acción genotóxica diferente presentan el mismo efecto de potenciación citotóxica.

En lo que respecta al estudio de electroforesis unicelular en gel el extracto no presentó ninguna célula con cometas por lo que indica que el extracto no es un agente que origine un daño al material genético. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Martínez y Flores que encontraron que el cuachalalate per se no induce la producción de micronúcleos en EPC de ratón a dosis de 500, 1000 y 1500 mg/Kg.

El peróxido de hidrógeno si presentó un daño al material genético, ya que en la relación longitud-diámetro se observa una diferencia estadística significativa con respecto al testigo negativo, esto representa que es un agente genotóxico, sin embargo estos resultados no pueden ser comparados con trabajos previos ya que no se han encontrado referencias donde se utilice al peróxido de hidrógeno *in vivo*, pero comparados con el trabajo realizado por Olive y col., en 1994 donde reportan que en las caudas obtenidas *in vitro* se presentan valores de longitud-diámetro mayores a las obtenidas en el presente estudio, algo similar ocurre en el estudio realizado por Vrzoc, en 1996 donde se obtuvieron resultados de 7.10 micrómetros. Una posible explicación sería que por la presencia de antioxidantes exógenos y endógenos, por ejemplo, exógenamente el alimento que consumieron los animales tratados contiene antioxidantes, y por otro lado, los organismos poseen mecanismos antioxidantes enzimáticos; ambos actúan interrumpiendo la reacción en cadena que originan los radicales libres (Kanno y col., 1999). Esto explicaría por que el tamaño de los cometas obtenidos *in vivo* es significativamente menor a los reportados en sistemas *in vitro*.

Los resultados obtenidos en el grupo tratado con el peróxido de hidrógeno y el extracto de cuachalalate mostraron una disminución en la relación longitud/diámetro teniendo así un 14.3% de inhibición, por lo que podemos decir que el extracto de cuachalalate, fue un discreto agente antigenotóxico. Comparando estos resultados con los obtenidos por Martínez y Flores en 2003, los cuales indicaron que el extracto disminuyó el número de micronúcleos inducidos por la ifosfamida hasta en un 80% en la dosis de 1500 mg/Kg. Podemos suponer que la gran diferencia en la capacidad inhibitoria de daño al ADN en realidad se debe a que el agente que utilizamos como control positivo, o sea el peróxido de hidrógeno, no induce el suficiente daño para evidenciar la capacidad antigenotóxica del extracto de cuachalalate.

Por otro lado, al analizar el daño al material genético, sólo en el grupo tratado con la combinación de compuestos se encontraron células con características propias de la apoptosis (Figura 13) en un bajo porcentaje que fue del 2.3%. Roser y col., en 2001 encontraron que al utilizar un agente inductor nato de apoptosis, este originó menos del 37% de células apoptóticas, por lo que nuestros resultados no descartan la posibilidad de que se lleve a cabo un mecanismo de apoptosis por parte del extracto, sin embargo, dejan duda sobre el efecto e incluso podrían estar presentes otros mecanismos diferentes de protección celular.

Una posible explicación de estos resultados sería que el mecanismo de apoptosis que produce fragmentos de ADN característicos de 180 pares de bases de longitud, los cuales son los que dan la forma característica de "lágrima" a los cometas, se presentó en muy pocas células, debido a que el daño producido por el peróxido de hidrógeno in vivo fué muy leve. De tal manera si existen pocas células dañadas y los cometas formados sólo exhiben caudas pequeñas y características de genotoxicidad y por lo tanto el extracto de cuachalalate no ejerce sobre estas acción apoptótica.

Sin embargo, para poder evidenciar un evento apoptótico se pueden realizar técnicas específicas para poner en evidencia al fenómeno apoptótico.

## CAPITULO 6 CONCLUSIONES

- ⊕ El peróxido de hidrógeno presentó un 100% de células con cometas sin embargo se comportó como un agente ligeramente genotóxico a dosis de 500 mg/Kg
- ⊕ El extracto de cuachalalate no presenta producción de cometas, lo que indica que los componentes del extracto no originan daño genotóxico.
- ⊕ La viabilidad celular disminuyó en el grupo tratado con la combinación de extracto y peróxido de hidrógeno lo que indica que hay un efecto sinérgico, donde quizá este involucrado algún componente contenido en el cuachalalate.
- ⊕ Solamente en el grupo tratado con la combinación extracto-peróxido de hidrógeno se observó un 2.3% de células con cometas característicos de la apoptosis, lo cual es un porcentaje bajo, sin embargo por ello no se descarta la acción apoptótica como mecanismo anticancerígeno del extracto de cuachalalate.

## CAPITULO 7 REFERENCIAS

- 1.-Abbas, K.(2000). Inmunología celular y molecular. Ed. Mc Graw-Hill.749pp
- 2.- Álvarez,J. (1998). Enciclopedia de México. USA. 1899pp
- 3.-Apoptosis (2003). [www.apoptosis.edu](http://www.apoptosis.edu)
- 4.-Ashby, J. (1995). The single cell gel assay for induced DNA damage ( comet assay): Measurement of tail length and moment. *Mutagenesis* 10:85-90
- 5.-Barcelo, J. (1982). Diccionario terminológico de química. España. Editorial Alambra 769pp
- 6.-Barton, H., Seoane, E. (1956). Triterpenoids. The constitution and stereochemistry of masticadienonic acid. *J. of Chemistry Society* 801:4150-60
- 7.- Berke, G (1995). The CTL's kiss of death. *Cell* 81:9
- 8.- Betancourt, Y. (2001). 1000 plantas medicinales y aromáticas de México. Jardín botánico de Tlaxcala. [www.sdnr.undp.org](http://www.sdnr.undp.org)
- 9.- Dizz,C & Schrort, A. (1996). Role of translocases in the generation of phosphatidilserine asymmetry. *J. Membr. Biol.* 151:1
- 10.- Domínguez, X., Franco, R., García, S., Delgado, J. (1983)Plantas medicinales mexicanas XLVIII. Estructura del ácido instiopolinacico separado de la corteza del cuachalalate. *Sch. Rev. Latinoamericana de Química.* 14:99
- 11.-Envejecimiento (2003) <http://www.envejecimiento.com>
- 12.-Fernández, J., Navarrete, C. (2001). Valoración del efecto cicatrizante del cuachalalate.<http://www.depa.pqui.unam.mx>
- 13.- Fitoterapia (2001) <http://www.fitoterapia.org>
- 14.- González, E., McKenna, G., Delgado, J. (1962). Anticancer evaluation of *Amphipterygium adstringes*. *J. Pharmaceutical sciences* 51:642-651

- 15.- Grim, L., Golderg, A., Poirer, G., Schwartz, L. & Osborne, B. (1996). Proteasomes play an essential role in the thymocyte apoptosis. *EMBO* 15:3835
- 16.- Herbolaria (2002) <http://www.herbolaria.com>
- 17.- Hinggis, C. (1994). Flip-flop: The transmembrane translocation of lipids. *Cell* 79:393
- 18.- Kanno, S., Ishikawa, M., Takayanagi, M., Takayanagi, Y., Sasaki, K.I. (2000). Characterization of hydrogen peroxide-induced apoptosis in mouse primary cultured hepatocytes. *Biological & Pharmaceutical Bulletin* 23:37-42
- 19.- Kanno, S., Ishikawa, M., Takayanagi, M., Takayanagi, Y., Sasaki, K.I. (1999). Exposure to hydrogen peroxide induced cell death via apoptosis in primary cultured mouse hepatocytes. *Biological & Pharmaceutical Bulletin* 22:1296-1300
- 20.- Kirk, P. (1995) *Enciclopedia metodológica*. Editorial Panamericana 13:769
- 21.- Larousse Temático (1998). Editorial Larousse 1359pp
- 22.- Lodish, H., Berk, A. (2001). *Biología celular y molecular*. Panamericana. Argentina. 1084pp
- 23.- Martin, S. & Green, D. (1995). Protease activation during apoptosis: death by a thousand cuts? *Cell* 82:34
- 24.- Martínez, M. (1991). *Catálogo de nombres vulgares y científicos de plantas mexicanas*. Fondo de la Cultura Económica. México
- 25.- Martínez, E., Flores, G. (2003) Estudio de la acción anticlastogénica del cuachalalate (*Amphipterygium adstringens*) sobre la inducción de micronúcleos producidos por ifosfamida. Tesis profesional FESC. UNAM

- 26.- Mata, R., Calzada, F., Navarrete, A., del Río, F., Delgado, G. (1991). Long-chain phenols from the bark of *Amphipterygium adstringens*. *J. Ethnopharmacology* 43:147-154
- 27.-McKelvey-Martin, V., Green, M., Schmezer, P., deMeo, M., Collins, A. (1993). The single gel electrophoresis assay (comet assay): a European review. *Mutation Research* 288:47-63
- 28.-Miyamae, Y., Yamamoto, M., Sasaki, Yu., Kobayashi, H., Miyuki, I.S., Shimouri, K., Hayashi, M. (1998). Evaluation of tissue homogenization technique the isolates nuclei for the vivo single gel electrophoresis (comet) assay: a collaborative study by five laboratories. *Mutation research* 418:131-140
- 29.- Navarrete, C.,(1982). Estudio químico y pruebas farmacológicas a la corteza de *Juliana adstringens*. Tesis profesional FESZ.UNAM
- 30.- Olive, D.(1995).Factors influencing ADN migration individual cell subjected to gel electroforesis. *Mutation Research* 339:643-652
- 31.- Olive. P., Banath,R., McCoy, M. (1994). Duracing, heterogenety in radiation-induced DNA damage and repair in tumor and normal cell using comet assay. *Radiat. Res.* 122:86-94
- 32.-Olivera, O., Martínez, V., Soto, H., Solares, A. (1999) Phytochemical study of cuachalalate ( *Amphipterygium adstringens* Schiede ex Schelecht) *J. of Ethnopharmacology* 68:109-113
- 33.-Plantas que curan (2000). Enciclopedia de las plantas que curan. Editorial Planeta 855 pp.
- 34.-Renehan,M A., Booth, C., Potte, C. (2001). What is apoptosis and why is it important? *BMJ* 332:1536

- 26.- Mata, R., Calzada, F., Navarrete, A., del Río, F., Delgado, G. (1991). Long-chain phenols from the bark of *Amphipterygium adstringens*. *J. Ethnopharmacology* 43:147-154
- 27.-McKelvey-Martin, V., Green, M., Schmezer, P., deMeo, M., Collins, A. (1993). The single gel electrophoresis assay (comet assay): a European review. *Mutation Research* 288:47-63
- 28.-Miyamae, Y., Yamamoto, M., Sasaki, Yu., Kobayashi, H., Miyuki, I.S., Shimouri, K., Hayashi, M. (1998). Evaluation of tissue homogenization technique the isolates nuclei for the vivo single gel electrophoresis (comet) assay: a collaborative study by five laboratories. *Mutation research* 418:131-140
- 29.- Navarrete, C.,(1982). Estudio químico y pruebas farmacológicas a la corteza de *Juliana adstringens*. Tesis profesional FESZ.UNAM
- 30.- Olive, D.(1995).Factors influencing ADN migration individual cell subjected to gel electroforesis. *Mutation Research* 339:643-652
- 31.- Olive. P., Banath,R., McCoy, M. (1994). Duracing, heterogenety in radiation-induced DNA damage and repair in tumor and normal cell using comet assay. *Radiat. Res.* 122:86-94
- 32.-Olivera, O., Martínez, V., Soto, H., Solares, A. (1999) Phytochemical study of cuachalalate ( *Amphipterygium adstringens* Schiede ex Schelecht) *J. of Ethnopharmacology* 68:109-113
- 33.-Plantas que curan (2000). Enciclopedia de las plantas que curan. Editorial Planeta 855 pp.
- 34.-Renehan,M A., Booth, C., Potte, C. (2001). What is apoptosis and why is it important? *BMJ* 332:1536

## ESTA TESIS NO SALE DE LA BIBLIOTECA

- 35.- Rosas, A.H. (2000). Análisis fitoquímico de *Cytocarpaprocera* HBK y *Amphipterygium adstringens*. Schiede ex Schecht. Tesis de maestría Colegio de Posgraduados de Chapingo. Instituto de Recursos Naturales. Estado de México. 3-19
- 36.-Roser,S.,Pool-zobel, B., Rechkemmer, G. (2001). Contribution of apoptosis responses in the comet assay. *Mutation Research*. 497:169-175
- 37.-Singh, N., McCoy, M., tice, R., Schineider, E. (1998)- A simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cell. *Exp. Cell. Res.* 175:184-191
- 38.- Schumb, W., Stterfield, R., Wentworth, L. (2000). Hydrogen peroxide. Reinhold Publising Co. New York
- 39.-Tamayo, F. (1997). Fundamentos de Inmunología. UNAM 791pp
- 40.- van Engeland, M., Ramackers, F., Schutle, B & Reutelingsperger,C. (1996). A novel assay to measure loss of plasma membrane asymmetry during apoptosis of adherent cell in culture. *Cytometry*. 24: 131
- 41.-Vrzoc, M., Petras, M. (1996)Comparison of the three power supplies used for the single cell gel assay. *Environ. Molec. Mutag* 28:145-157
- 42.- Wang, J., Quian, B., Bei, L. (1997). Detection of DNA damage in peripheral lymphocytes by 7 compounds using comet assay. *Zhungguo Youli; Xuebao* 18:451-454
- 43.-Wyllie, A., Morris, R.G., Smith, A., Dunlop, D. (1998).Chromatin cleavage in apoptosis: association with condensed chromatin morphology and dependece on macromolecular synthesis. *J. Phatol.* 142:67
- 44.-Wu, M., Ping, H.F., Fiher, D. (2003) Apoptosis:Molecular mechanisms. *Encyclopedia of Life Sciences* <http://www.els.net/els>

- 45.- Youchi, M., Mika, Y., Yu.F, s., Hiroshi, K., Miyuki, I.S., Kayoko, S.(1997).Evaluation of a tissue homogenization technique that isolates nuclei for the in vivo single cell gel electrophoresis (comet) assay: a collaborate study by five laboratories. *Mutation Research*. 418:131-140
- 46.- Yun-Bol, H., Chi, S., Shimouri, T.(1996).Programmed cell death. Plenum. Press. New York.1794pp