



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA

**Efecto del ácido 6-nonadecil salicílico
sobre el daño genético producido por
ifosfamida.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

B I Ó L O G A

P R E S E N T A

BRENDA FRANCO MARCELO

Directora de tesis: Dra. Hortensia Rosas Acevedo.

México, D. F. Octubre de 2011.





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por haberme permitido vivir y haberme dado salud para lograr mis objetivos, además de su infinita bondad y amor al regalarme una familia maravillosa.

A mis padres, por su infinito amor e incondicional apoyo en todos los proyectos que he emprendido, y darme la oportunidad de llegar hasta éste sendero brindándome todas las herramientas necesarias para la vida.

A mis hermanos Isaac, Daniel y Paulina por su amor, comprensión y apoyo, por la confianza que siempre nos hemos tenido y ser siempre mi fuente de inspiración para ser mejor.

A la magna Universidad Nacional Autónoma de México, y en especial a la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, por acogerme como su hija y haberme proporcionado los medios para poseer los conocimientos de los que dispongo.

A los miembros del jurado Dra. Leonora Sánchez García Figueroa, Dra. Elia Roldán Reyes, M. en B.E. Enrique Mendieta Márquez y Biól. José Misael Vicente Hernández Vázquez, por su valiosa colaboración y atinados comentarios vertidos al respecto.

A la Dra. Hortensia Rosas Acevedo, por su amistad, apoyo y comprensión, y cuya sabiduría e infinita paciencia, fungieron como pilares de esta investigación.

A mis amigos Héctor, Jorge, Luis, Aline, Lex, Harold, Sam, Azu, Betty, Gaby, Martha y Francisco por compartir conmigo momentos felices y tristes, y hacer de la licenciatura los mejores años de mi vida escolar.

Porque la vida se trata de las mamás, de los papás, de los hermanos, de los amigos, de las personas que te quieren, de caminatas en la playa, ser fiel a tus instintos escuchando a tu corazón. ¿Pero realmente se trata de ellos, o de lo que representan? Claro, porque en realidad se trata de bajar la luna, soñar en grande, resistir, protegerse, descargarse, aferrarse, abrazarse, caer con estilo, pararse con orgullo o simplemente seguir adelante, superar las expectativas y ser mujer. ¿O podría ser que todo esto realmente significa que el universo intenta decirnos algo?

Naaah se trata de casquitos de football.

ÍNDICE TEMÁTICO.

	Página
ÍNDICE DE CUADROS.	II
ÍNDICE DE FIGURAS.	II
ÍNDICE DE GRÁFICAS.	III
1. RESUMEN	1
2. INTRODUCCIÓN.	2
2.1. Plantas medicinales en México.	2
3. ANTECEDENTES.	4
3.1. Cuachalalate.	4
3.2. Estudios químicos y farmacológicos de cuachalalate.	5
3.3. Ácidos anacárdicos.	7
3.4. Ácido 6-nonadecil salicílico.	8
3.5. Cáncer.	8
3.5.1. Segundos cánceres primarios.	12
3.6. Quimioterapia e ifosfamida	12
3.7. Evaluación de daño genético.	18
4. JUSTIFICACIÓN.	21
5. HIPÓTESIS.	21
6. OBJETIVOS.	22
7. MATERIALES Y MÉTODO.	23
7.1. Recolecta del material biológico.	23
7.2. Obtención del compuesto.	23
7.3. Evaluación de la actividad genotóxica.	23
8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.	26
8.1. Actividad citotóxica	27
8.2. Actividad genotóxica	32
9. CONCLUSIONES.	37
10. SUGERENCIAS.	38
11. LITERATURA CITADA.	39
12. ANEXOS	43

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro	Página
1. Quimioterapéuticos útiles en enfermedades neoplásicas (tomado y modificado de Chabner <i>et al.</i> , 2006).	14
2. Frecuencia de eritrocitos policromáticos y eritrocitos policromáticos miconucleados (EPC-MN) en ratones CD1 tratados vía oral con el ácido 6-nonadecil salicílico e ifosfamida (A6NDS + IFF).	26

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Página
1. Estructura química del ácido 6-nonadecil salicílico	8
2. Mecanismo de acción de fármacos alquilantes (Chabner <i>et al.</i> , 2006)	16
3. Estructura química de ciclofosfamida e ifosfamida (Chabner <i>et al.</i> , 2006)	17
4. Proceso de eritropoyesis <i>in vivo</i> y formación de micronúcleos (MN) en los eritrocitos (Krishna y Hayashi, 2000).	20

ÍNDICE DE GRÁFICAS

Gráfica	Página
1. Efecto del A6NDS + IFF en la frecuencia de eritrocitos policromáticos en 2000 eritrocitos de ratón a 0 h.	27
2. Efecto del A6NDS + IFF en la frecuencia de eritrocitos policromáticos en 2000 eritrocitos de ratón a 24 h.	28
3. Efecto del A6NDS + IFF en la frecuencia de eritrocitos policromáticos en 2000 eritrocitos de ratón a 48 h.	29
4. Efecto del A6NDS + IFF en la frecuencia de eritrocitos policromáticos en 2000 eritrocitos de ratón a 72 h.	30
5. Efecto del A6NDS + IFF en la frecuencia de micronúcleos en 2000 eritrocitos policromáticos de ratón a 0 h.	32
6. Efecto del A6NDS + IFF en la frecuencia de micronúcleos en 2000 eritrocitos policromáticos de ratón a 24 h.	33
7. Efecto del A6NDS + IFF en la frecuencia de micronúcleos en 2000 eritrocitos policromáticos de ratón a 48 h.	33
8. Efecto del A6NDS + IFF en la frecuencia de micronúcleos en 2000 eritrocitos policromáticos de ratón a 72 h.	35

1. RESUMEN.

Amphipterygium adstringens, también conocido como cuachalalate es una especie que se utiliza en la medicina tradicional mexicana, principalmente para el tratamiento de úlcera gástrica y cáncer de estómago, de su corteza se han aislado diferentes compuestos entre los que encontramos a los ácidos anacárdicos, para los cuales, en la literatura se ha informado que poseen actividad biológica diversa; son agentes citotóxicos, poseen actividad antibacterial y genoprotectora, son inhibidores de enzimas y actúan como desacopladores de electrones. En el presente trabajo se evaluó el efecto del ácido 6-nonadecil salicílico sobre la actividad citotóxica y el daño genético producido por ifosfamida.

El ácido 6-nonadecil salicílico mostró un sinergismo con la ifosfamida en la actividad citotóxica. Se observó que todas las dosis evaluadas del ácido 6-nonadecil salicílico presentan una reducción significativa en la frecuencia de eritrocitos policromáticos a partir de las 48 h y hasta las 72 horas.

La frecuencia de micronúcleos presentes cuando se administró el ácido 6-nonadecil salicílico junto con la ifosfamida fue mayor que la frecuencia de micronúcleos que produce el agente antineoplásico, por lo que el ácido 6-nonadecil salicílico no protege contra el daño genético producido por la ifosfamida.

2. INTRODUCCIÓN.

2.1. Plantas medicinales en México.

Los países latinoamericanos poseen gran parte de la biodiversidad del mundo. Solamente Brasil posee cerca del 20-22% de todas las plantas y microorganismos existentes. Sin embargo, se estima que no más de 25,000 especies de plantas han sido objeto de alguna clase de investigación científica. Los países latinoamericanos tienen docenas de miles de especies de plantas, y también son muy ricos en animales, microorganismos y recursos marinos. A pesar de la riqueza de recursos, estos países nunca han usado apropiadamente su gran biodiversidad en beneficio de su propio desarrollo. Además, en función de la incontrolable explotación, muchas de las áreas biodiversamente relevantes de estos países comienzan a reducirse año a año, y animales importantes y especies de plantas desaparecen. A pesar de los muchos esfuerzos individuales de los gobiernos para preservar la biodiversidad para futuras generaciones, los conocimientos tradicionales, especialmente aquéllos que derivan de medicina tradicional como los conocimientos indígenas, también desaparecen. Verdaderamente, considerables esfuerzos y fundaciones serán necesarios para preservar convenientemente la biodiversidad. El total de publicaciones sobre plantas medicinales en los países latinoamericanos durante los últimos 25 años se ubica de la siguiente manera: Brasil 3722 (41.6%), México 1781 (19.9%), Argentina 1741 (19.5%), Chile 573 (6.4%), Venezuela 394 (4.4%), Colombia 265 (2.9%), Perú 214 (2.4%), Cuba 182 (2%) y Uruguay 69 (0.8%) (Calixto, 2005).

El uso de plantas con propiedades medicinales para el tratamiento, cura y prevención de enfermedades es uno de los métodos medicinales más antiguos conocidos en la historia. A principios de la década de 1990, la Organización Mundial de la Salud declaró que 65-80% de la población de los países en desarrollo depende de las plantas medicinales como la única forma de atención básica de salud (Akerlele, 1993).

Las plantas medicinales son un elemento importante de los sistemas médicos indígenas en México. Estos recursos son usualmente considerados como parte de una cultura de conocimientos tradicional. La mayoría de los estudios sobre plantas medicinales se centran en el papel de éstas dentro de una cultura, es decir, un grupo étnico (Heinrich *et al.*, 1998).

Uno de los numerosos objetivos de la etnobotánica médica es la selección de especies de plantas culturalmente importantes para fomentar la evaluación de su actividad farmacológica.

Los conocimientos de las plantas medicinales son una parte de la antigua cultura y aún son utilizados por los habitantes de México. Durante un estudio etnobotánico en tres comunidades mayas, fueron documentadas 360 plantas medicinales y 1828 reportes sobre sus usos (Ankli *et al.*, 2002).

En México, el uso de plantas medicinales para tratar diferentes desórdenes está ampliamente difundido. Sin embargo, la mayoría de las especies de estas plantas no han sido investigadas desde un punto de vista farmacológico para demostrar sus propiedades terapéuticas (Velázquez *et al.*, 2006).

3. ANTECEDENTES.

3.1. Cuachalalate.

Amphipterygium adstringens comúnmente conocido como cuachalalate es una planta endémica de México y pertenece a la familia Anacardiaceae (*Amphipterygium adstringens* Schiede ex Schlecht (syn *Juliana adstringens* Schlecht) Julianiaceae. Olivera-Ortega *et al.*, 1999). En las zonas nahuas del altiplano central se conoce bajos los nombres de: cuauchalalate, cuauchalalá. En Michoacán con los de: matixerán, macerán, pacueco. En Oaxaca se le conoce como cuachinala y en Puebla la gente lo conoce como volador. La misma especie de cuachalalate se conoce, con las sinonimias *Juliana adstringens* Schlechter y *Hypoterygium adstringens* Schlechter (Rojas, 2001).

El cuachalalate es un árbol que crece hasta una altura de 6 metros o más; tiene un tronco torcido y corteza de color gris marrón; al final de cada ramilla hay un manojo de hojas compuestas de cinco hojuelas sésiles, aserradas, con dienteillos redondeados, casi todas abovedadas, en el anverso son verde opaco y en el reverso verde grisáceo; el fruto consiste en nueces alongadas, abultadas, aladas de 2.5 a 5 cm de largo y de color verde pálido, es una planta resinosa medicinal comúnmente usada en México (Rojas, 2001). Algunas personas la atribuyen propiedades curativas tales como cicatrización, reducción del colesterol, antiinflamatoria, antibiótico, para disolver cálculos renales, eliminar cólicos y fiebre, cáncer del tracto digestivo y úlceras gástricas (Olivera-Ortega *et al.*, 1999).

Amphipterygium adstringens vegeta en la selva baja caducifolia de los estados de Michoacán, Guerrero, Puebla y Oaxaca. En general, la especie existe en tierra caliente, en los climas semitropicales y templados, en elevaciones a partir de 100 metros a 3 mil metros sobre el nivel del mar, desde el bosque espinoso seco, caducifolio, y subcaducifolio, de matorral xerófilo, hasta los encinales de montaña (bosques mesófilos de montaña predominantemente latifoliados), se encuentra con mayor frecuencia en el primero (Rojas, 2001).

En el Estado de Morelos, el cuachalalate se puede encontrar con frecuencia en la selva baja caducifolia. Se le ha encontrado en el "Cañón de los Lobos", en la Sierra de Huautla, en los alrededores de Xoxocotla, en los municipios de Yautepec, Yecapixtla, Miacatlán, Coatlán, Puente de Ixtla, Amacuzac, Tlaquiltenango, Tlaltizapán y Jojutla, entre otros (Rojas, 2001).

3.2. Estudios químicos y farmacológicos de cuachalalate.

En México se ha realizado la mayor parte de la investigación química sobre esta planta. La mayoría de los estudios hacen alusión a la composición química de la corteza del tallo de esta especie, en ella, se han identificado triterpenos, esteroides, compuestos fenólicos y carbohidratos (Rosas, 2005).

Los triterpenoides presentes en la especie son los ácidos cuachalalatoico, 3 α - y 3-epimasticadienónico, isomasticadienónico, epi-oleanólico, instipolinásico, oleanólico, masticadienónico y 3 α -hidroximasticadienónico; entre los compuestos fenólicos están los ácidos anacárdicos: ácidos 6-heptadecil-salicílico, 6-nonadecil-salicílico y 6-pentadecil-salicílico. También se han aislado β -sitosterol, una mezcla de ácidos anacárdicos y aldehídos fenólicos (Argueta *et al.*, 1994; Navarrete *et al.*, 1989; Olivera-Ortega *et al.*, 1999). En 1998, Benítez informó la presencia de sacarosa y en el 2004 Makino y colaboradores informaron que del extracto etanólico de la corteza de esta especie aislaron 5 nuevos triterpenos tipo tirucalano, los cuales fueron identificados como: ácido 3 α -hidroxi-6-oxo-7,24Z-tirucaladien-26-oico, ácido 3,7-dioxo-8,24Z-tirucaladien-26-oico, ácido 3 α -hidroxi-7-oxo-8,24Z-tirucaladien-26-oico, ácido 7,11-dioxo-3 α -hidroxi-8,24Z-tirucaladien-26-oico y ácido 3,8-dioxo-7 β -hidroxi-7,9-ciclo7,8 seco-24Z-tirucaladien-26-oico (Rosas, 2005).

Estudios farmacológicos sobre esta especie han mostrado que los extractos de metanol y hexano presentan actividad antiulcerosa e hipocolesterolémica respectivamente (Rosas, 2005).

En una recopilación que hacen Argueta y colaboradores (1994), se informa que una investigación realizada *in vivo* utilizando ratas demostró que la administración subcutánea del extracto hexánico de la corteza en una dosis de 100 mg/kg de peso indujo un efecto hipocolesterolemizante significativo, disminuyendo los niveles de colesterol en un 31%, asimismo, el cocimiento de la corteza y un extracto de acetato de etilo (AcOEt) administrados en ratas por vía oral e intraperitoneal ejercieron un efecto antiulcerogástrico inhibiendo la secreción de jugo gástrico estomacal y contribuyendo a la más rápida cicatrización del epitelio y de la mucosa gástrica.

Los ácidos masticadienónico y 3 α -hidroximasticadienónico ejercieron un efecto hipocolesterolemizante en ratas Wistar, al administrarse por vía subcutánea en una dosis de 17 mg/kg. El colesterol sanguíneo se midió 24 h después de la inyección y se obtuvo un decremento promedio de 34 mg/100 mL y 19 mg/100 mL, 45 y 27%, respectivamente (Navarrete, 1982).

También se ha demostrado la actividad antitumoral de los extractos metanólicos de la corteza en ensayos *in vivo* en ratones con adenocarcinoma mamario (González *et al.*, 1962).

El ácido masticadienónico, 3 α -hidroximasticadienónico, 3-epi-oleanólico y β -sitosterol en dosis de 0.1, 0.3, 1, 3, 10, 30 y 100 mg/kg ejercieron un efecto gastroprotector. El compuesto con mayor actividad fue ácido 3-epi-oleanólico, seguido por el ácido 3 α -hidroximasticadienónico, β -sitosterol y ácido masticadienónico (Benítez, 1998).

Giner-Larza y colaboradores (2002) evaluaron la citotoxicidad de los ácidos masticadienónico y 3 α -hidroximasticadienónico en un ensayo *in vitro*. Los resultados demostraron que el ácido masticadienónico es citotóxico a concentraciones de 100 y 30 μ M. También observaron que el ácido 3 α -hidroximasticadienónico no fue activo y que éste suprime completamente la producción de leucotrienos B₄ de los leucocitos polimorfonucleares (LPMN).

Martínez y Flores (2003) informaron que el extracto hexánico al ser evaluado en ratones de la cepa CD1 a dosis de 500, 1000 y 1500 mg/kg disminuye la frecuencia de eritrocitos policromáticos micronucleados producidos por ifosfamida; es decir ejerce un efecto antígenotóxico, La dosis de 1500 inhibió la formación de micronúcleos en 90%, también observaron que el extracto a las mismas concentraciones no aumenta la frecuencia de micronúcleos en eritrocitos policromáticos (es decir no induce daño cromosómico).

Oviedo-Chávez y colaboradores (2004) informaron sobre la actividad anti-inflamatoria de los extractos acuoso y hexánico, al evaluarla utilizando dos modelos agudos inflamatorios. Observaron que en el modelo en el cual se induce un edema en la pata de ratón, el extracto acuoso presenta una inhibición de un 73.5% y el extracto hexánico de 14.4%. En el segundo modelo, en el cual se induce un edema en la oreja de ratón, se observó que el extracto hexánico posee una actividad dosis dependiente, mientras que el extracto acuoso no presenta tal efecto.

3.3. Ácidos anacárdicos.

Los ácidos anacárdicos han sido aislados no solo en los miembros de la familia Anacardiaceae (por ejemplo *Anacardium occidentale*) sino también en especies de otras familias incluyendo *Ginkgo biloba* (Ginkgoaceae). Este tipo de compuestos poseen diversas propiedades biológicas, se ha descrito que son citotóxicos, antibacteriales (los ácidos anacárdicos exhiben una potente actividad sobre bacterias Gram positivas), son agentes inhibidores de enzimas (ej. disminuyen la producción de fosfatidilinositol, específicamente inhibiendo a la fosfolipasa C, una enzima que esta asociada con la progresión tumoral) y desacopladores de electrones (ej. exhiben un efecto desacoplador de electrones en la fosforilación oxidativa en mitocondrias de hígado de rata; el efecto es muy similar a un desacoplador bien conocido cómo lo es 2,4-dinitrofenol) (Rosas *et al.*, 2006).

3.4. Ácido 6-nonadecil salicílico.

El ácido 6-nonadecil salicílico (A6NDS, Fig. 1) se ha aislado del extracto hexánico de la corteza de *Amphipterygium adstringens*. Existen pocos trabajos acerca de la actividad biológica de este compuesto; en el 2006 Rosas y colaboradores informaron por primera vez que dicho compuesto es citotóxico (siendo más activo en la línea de cáncer de colón HCT15) y no tiene efectos genotóxicos (no produce daño cromosómico, daño que está asociado con la aparición y progresión de tumores), así mismo sugieren que posee actividad genoprotectora (Se observó que a dosis de 10 mg/kg disminuyó la frecuencia en la relación de eritrocitos policromáticos y eritrocitos normocromáticos [EPC/ENC], y eritrocitos policromáticos micronucleados [EPC·MN]).

En 1989, Navarrete y colaboradores informaron que la mezcla de los ésteres metílicos de los ácidos 6-nonadecil salicílico, 6-heptadecil salicílico y 6-pentadecil salicílico no fue tóxica a *Artemia salina* ($CL_{50} > 1000$ ppm). Más recientemente Castillo-Juárez y colaboradores (2007) informaron que los ácidos anacárdicos de cuachalalate poseen actividad anti-*Helicobacter pylori*.

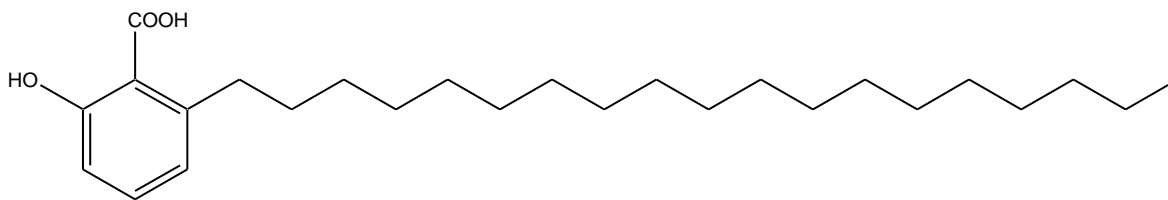


Fig. 1. Estructura química del ácido 6-nonadecil salicílico

3.5. Cáncer.

El cáncer es un grupo de enfermedades caracterizadas por crecimiento celular descontrolado. El cáncer es causado tanto por factores externos (agentes

infecciosos bacterianos o virales, sustancias químicas y exposición a la radiación) como por factores internos (mutaciones heredadas, desequilibrio hormonal, condiciones que afectan el sistema inmunológico, y las mutaciones que se producen a partir del metabolismo, es decir, mutaciones aleatorias en la síntesis de las proteínas celulares como consecuencia de la inestabilidad genómica en las células transformadas (Parslow *et al.*, 2002)). Estos factores causales pueden actuar juntos o en secuencia para iniciar o promover el carcinogénesis. Diez años o más pasan a menudo entre la exposición a los factores externos y el cáncer detectable. El cáncer es tratado con cirugía, radiación, quimioterapia, terapia hormonal (American Cancer Society, 2009).

En los tejidos normales, las tasas de crecimiento de nuevas células y la muerte de células viejas se mantienen en balance. El cáncer se origina por una pérdida de control del crecimiento normal o de la pérdida de una habilidad de la célula de someterse a un proceso natural conocido como "apoptosis" (mecanismo mediante el cual las células viejas o dañadas normalmente se autodestruyen).

El aumento gradual en el número de células con capacidad para dividirse crea una masa creciente de tejido conocido como un "tumor" o "neoplasia". Los tumores malignos son tumores capaces de diseminarse por invasión y por metástasis. La invasión se refiere a la migración y penetración directas de las células cancerosas en los tejidos vecinos. La metástasis se refiere a la habilidad de las células cancerosas para penetrar dentro de los vasos linfáticos y sanguíneos, diseminarse por el torrente sanguíneo y finalmente invadir los tejidos normales en otras partes del cuerpo.

El cáncer no se considera como una enfermedad que se hereda debido a que la mayoría de los casos de cáncer, quizá el 80 a 90 por ciento, ocurren en personas sin historia familiar de la enfermedad. Sin embargo, la probabilidad de que una persona desarrolle cáncer puede ser influida por la herencia de ciertos tipos de alteraciones genéticas. Las mutaciones heredadas pueden influir en el riesgo de una persona de desarrollar muchos tipos de cáncer, pero se piensa que estas

condiciones hereditarias están involucradas en sólo un 10 por ciento ó menos de todos los casos de cáncer.

Los genes pueden mutar (transformarse) de diferentes formas. La forma más sencilla de mutación implica un cambio en una base individual a lo largo de la secuencia de bases de un gen en particular. En otros casos, se pueden agregar o eliminar una o más bases. Y algunas veces, grandes segmentos de una molécula de ADN se repiten, se eliminan o se traslocan accidentalmente.

Un grupo de genes implicados en el desarrollo del cáncer son los genes dañados, conocidos como "oncogenes". Los oncogenes son los genes cuya presencia en cierta forma o cuya sobreactividad, o ambas, pueden estimular el desarrollo del cáncer. Cuando aparecen oncogenes en las células normales, ellos pueden contribuir al desarrollo del cáncer dando instrucciones a las células para que produzcan proteínas que estimulen la división y el crecimiento excesivos de células.

Al producir versiones o cantidades anormales de proteínas de control del crecimiento celular, los oncogenes hacen que el mecanismo de señalamiento del crecimiento de la célula se vuelva hiperactivo. Una célula cancerosa puede contener uno o más oncogenes, lo cual significa que uno o más componentes en este mecanismo serán anormales.

Un segundo grupo de genes implicados en el cáncer son los "genes supresores de tumor". Estos, son genes normales cuya ausencia puede conducir al cáncer. En otras palabras, si una célula pierde un par de genes supresores de tumor o si son inactivados por mutación, su falta de funcionamiento puede permitir que el cáncer se desarrolle. Los genes supresores de tumor son una familia de genes normales que ordenan a las células producir proteínas que restringen el crecimiento y la división celulares. Ya que los genes supresores de tumor codifican las proteínas que disminuyen el crecimiento y la división celulares, la pérdida de estas proteínas permite que la célula crezca y se divida de forma incontrolada. Un gen supresor de tumor en particular codifica la proteína conocida como "p53" la cual puede

provocar la muerte celular programada (apoptosis). En células que han sufrido daño en su ADN, la proteína p53 actúa como un "freno" que detiene el crecimiento y la división de las células. Si no se puede reparar el daño, la proteína p53, con el tiempo, iniciará la apoptosis, previniendo así el crecimiento descontrolado de las células genéticamente dañadas.

Los "genes reparadores de ADN" son la tercera clase de genes implicados en el cáncer. Estos, codifican proteínas cuya función normal es corregir errores que surgen cuando las células duplican su ADN antes de dividirse. Las mutaciones en los genes reparadores de ADN pueden conducir al fracaso en la reparación de ADN, lo cual a su vez permite que mutaciones subsecuentes se acumulen.

El cáncer puede empezar debido a la acumulación de mutaciones que incluyen a oncogenes, genes supresores de tumores y genes reparadores de ADN, las mutaciones también se observan en los genes que activan y desactivan a los carcinógenos y en los genes que gobiernan el ciclo celular, la senescencia celular (o "envejecimiento"), muerte celular (apoptosis), señalamiento celular y diferenciación celular. Además se pueden desarrollar otras mutaciones, las cuales le permiten al cáncer invadir y metastatizarse a otras partes del cuerpo.

El cáncer puede originarse casi en cualquier parte del cuerpo.

- **Los carcinomas**, los tipos más comunes de cáncer, se originan de las células de los epitelios. Los cánceres de pulmón, de seno (mama) y de colon son los más frecuentes de este tipo.
- **Los sarcomas** son cánceres que se originan de células que se encuentran en los tejidos de soporte del cuerpo, como por ejemplo, hueso, cartílago, tejido adiposo, tejido conectivo y músculo.
- **Los linfomas** son cánceres que se originan en los ganglios linfáticos y en los tejidos del sistema inmunológico del cuerpo.
- **Las leucemias** son cánceres de las células inmaduras de la sangre que crecen en la médula ósea y que tienen la tendencia a acumularse en

grandes cantidades en el torrente sanguíneo (National Cancer Institute, 2010).

3.5.1. Segundos cánceres primarios.

Warren y Gates definieron en 1932 que un Segundo Cáncer Primario (SCP) es aquel producido al menos con 2 cm de distancia al tumor primario, con al menos 5 años de diferencia en el tiempo entre uno y otro, que no debe ser una metástasis del primero y ambos deben tener confirmación histológica. Aunque la idea original se relacionaba con cánceres primarios de la cavidad oral y orofarínge, el concepto de los SCP se ha modificado y expandido a todo tipo de histologías, ubicaciones y relaciones temporales entre el primer y segundo cáncer primario, siendo hoy en día un concepto muy amplio. En la actualidad el término se emplea para hacer referencia a los cánceres ocurridos en sobrevivientes de cáncer, asociados a las propias terapias oncológicas o debido a la persistente exposición a factores de riesgo o carcinógenos como tabaco, alcohol, carcinógenos ambientales o a la presencia de alteraciones génicas o de la función inmune que se relacionan con la aparición de SCP, llegando a ser muy frecuentes, hasta un 16% de la incidencia total de cáncer según datos de la SEER (Surveillance, Epidemiology and End Results). Debido a la detección precoz del cáncer y a la mejora en las terapias oncológicas se ha producido una mayor sobrevida, por tanto, el riesgo de SCP se ha elevado, este hecho, sumado al envejecimiento de la población, incrementa el número de pacientes sobrevivientes de cáncer, así la sobrevida a 5 años esperada para adultos tratados por cáncer es superior a un 62% y mejora de un año a otro (Burgos *et al.*, 2009).

3.6. Quimioterapia e ifosfamida.

La capacidad de la quimioterapia para destruir las células cancerosas depende de su capacidad para detener la división celular. Usualmente, los fármacos actúan dañando el ARN o ADN que indica a la célula cómo realizar una copia de sí misma en la división. Si las células no pueden dividirse, mueren. Cuanto más rápido se

dividan las células, habrá más probabilidades de que la quimioterapia destruya las células y el tumor reduzca su tamaño. Además, estos fármacos inducen a la muerte celular programada (apoptosis) (Hamilton, 2010).

La quimioterapia es muy efectiva para destruir las células que se dividen rápidamente. Desafortunadamente, la quimioterapia no reconoce la diferencia entre las células cancerosas y las células normales. Las células "normales" volverán a crecer y ser saludables pero, mientras tanto, se presentan efectos secundarios. Las células "normales" afectadas con mayor frecuencia por la quimioterapia son las células sanguíneas, las que se encuentran en la boca, el estómago y el intestino, así como en los folículos pilosos; lo que provoca recuentos sanguíneos bajos, afecciones bucales, náuseas, diarrea y/o pérdida del cabello. Diferentes fármacos pueden afectar distintas partes del cuerpo (Hamilton, 2010).

Los fármacos que destruyen las células sólo durante la división se denominan específicos al ciclo celular. Los fármacos de quimioterapia que destruyen a las células cancerosas durante la fase de reposo se denominan no específicos al ciclo celular. La programación de la quimioterapia se realiza sobre la base del tipo de células, la velocidad con que se dividen y el momento en que un fármaco determinado probablemente sea eficaz. Es por esta razón que la quimioterapia normalmente se administra en ciclos (Hamilton, 2010).

En el Cuadro 1 se resumen los diversos tipos de fármacos utilizados en el tratamiento de enfermedades neoplásicas.

Cuadro 1. Quimioterapéuticos útiles en enfermedades neoplásicas (tomado y modificado de Chabner *et al.*, 2006).

CLASE	TIPO DE FÁRMACO
Fármacos alquilantes	<ul style="list-style-type: none">• Mostazas nitrogenadas• Etileniminas y metilmelaminas• Derivado de metilhidrazina• Alquilsulfonatos• Nitrosoureas• Triazenos• Complejos de coordinación de platino
Antimetabolitos	<ul style="list-style-type: none">• Análogos del ácido fólico• Análogos de la pirimidina• Análogos de la purina e inhibidores relacionados
Productos naturales	<ul style="list-style-type: none">• Alcaloides de la vinca• Taxanos• Epipodofilotoxinas• Camptotecinas• Antibióticos• Antracenedionas• Enzimas
Fármacos diversos	<ul style="list-style-type: none">• Ureas sustituidas• Agentes de diferenciación• Inhibidores de la proteincinasa de tirosina• Inhibidores de proteosoma• Modificadores de la respuesta biológica• Anticuerpos

Cuadro 1. Quimioterapéuticos útiles en enfermedades neoplásicas (tomado y modificado de Chabner *et al.*, 2006) (continuación).

CLASE	TIPO DE FÁRMACO
Hormonas y antagonistas	<ul style="list-style-type: none">• Supresores adrenocorticales• Adrenocorticoesteroides• Progestágenos• Estrógenos• Antiestrógenos• Inhibidores de aromatasa• Andrógenos• Antiandrógenos• Análogos de la hormona liberadora de gonadotropina

Los fármacos alquilantes quimioterapéuticos tienen en común la propiedad de convertirse en electrófilos potentes a través de la formación de intermedios del ion carbono o complejos de transición relacionados. Estos intermedios reactivos forman enlaces covalentes por alquilación de varias moléculas nucleofílicas, como los grupos fosfato, amino, sulfhidrilo, hidroxilo, carboxilo e imidazol. Sus efectos quimioterapéuticos y citotóxicos se relacionan directamente con la alquilación del ADN. El átomo de nitrógeno 7 de la guanina es particularmente susceptible a la formación de un enlace covalente con fármacos alquilantes bifuncionales y bien puede representar el objetivo principal que determina sus efectos biológicos. Otros átomos en las bases purina y pirimidina del ADN, incluyendo N1 y N3 en la adenina, N3 en la citosina y O6 en la guanina, reaccionan para formar enlaces con estos agentes, igual que los grupos amino y sulfhidrilo de las proteínas (Chabner *et al.*, 2006).

En la fig. 2 se ilustran las posibles acciones de los fármacos alquilantes en ADN con la mecloretamina (mostaza nitrogenada).

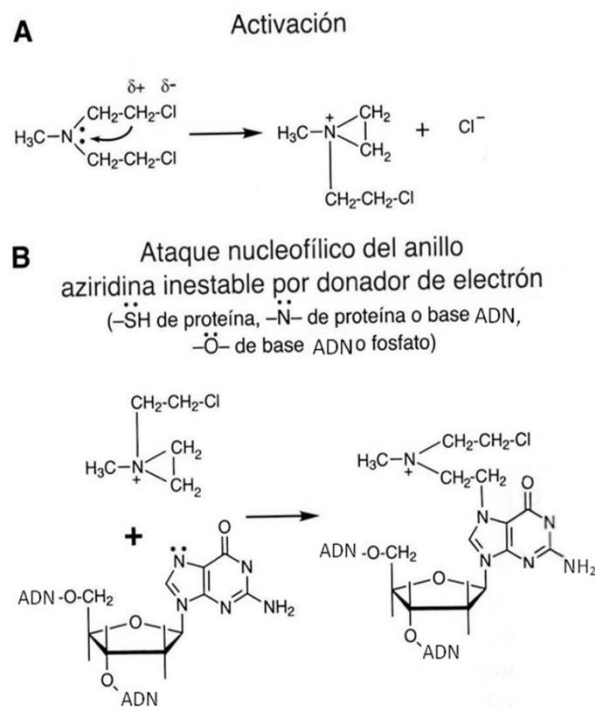


Fig. 2. Mecanismo de acción de fármacos alquilantes (Chabner *et al.*, 2006)

Las acciones farmacológicas más importantes de los fármacos alquilantes son las que alteran la síntesis de ADN y la división celular. La capacidad de estos fármacos de interferir con la integridad y función del ADN e inducir muerte celular en tejidos que proliferan con rapidez proporciona la base para sus propiedades terapéuticas y tóxicas.

Si bien ciertos fármacos alquilantes pueden tener efectos perjudiciales en tejidos con índices mitóticos normalmente bajos (p. ej., hígado, riñón y linfocitos maduros) estos tejidos con frecuencia se afectan en un periodo tardío. Los efectos agudos se manifiestan principalmente contra tejidos que proliferan con rapidez. La letalidad de la alquilación del ADN depende del reconocimiento del aducto (complejo de inclusión), la formación de roturas en la cadena de ADN por enzimas reparadoras y una respuesta apoptótica intacta. Aún no se caracteriza bien el

mecanismo real de la muerte celular relacionada con la alquilación del ácido desoxirribonucleico (Chabner *et al.*, 2006).

En células que no se dividen, el daño del ADN activa un punto de control que depende de la presencia de un gen p53 normal. Las células bloqueadas así en la interfase G₁/S reparan la alquilación del ADN o sufren apoptosis. Las células malignas que carecen de p53 o cuando éste está mutado no pueden suspender la progresión del ciclo celular, no sufren apoptosis y muestran resistencia a estos medicamentos (Chabner *et al.*, 2006).

La ifosfamida está químicamente relacionada con la mostaza nitrogenada y posee una estructura química similar a la de la ciclofosfamida (Fig. 3); es un fármaco de quimioterapia anticanceroso ("antineoplásico" o "citotóxico") administrado en el coctel de fármacos indicado en el tratamiento de cáncer. Este medicamento se clasifica como "agente alquilante". Los agentes alquilantes son más activos en la fase de reposo celular. Estos fármacos no son específicos al ciclo celular (Chabner *et al.*, 2006).



Fig. 3. Estructura química de ciclofosfamida e ifosfamida (Chabner *et al.*, 2006)

La ifosfamida es una oxazafosforina, similar a la ciclofosfamida. Esta última tiene dos grupos cloretilo en el átomo de nitrógeno exocíclico, en tanto que uno de los dos grupos cloretilo de la ifosfamida se encuentra en el nitrógeno fosfamida cíclico del anillo oxazafosforina. La ifosfamida es activada en el hígado por CYP3A4. La activación de la ifosfamida prosigue más lentamente con mayor producción de metabolitos desclorados y cloroacetaldehído. Probablemente, estas diferencias en el metabolismo explican las dosis más altas de ifosfamida necesarias para alcanzar efectos tóxicos equivalentes, la mayor neurotoxicidad de la ifosfamida y

las posibles diferencias en el espectro antitumoral de los dos fármacos (Chabner *et al.*, 2006).

La ifosfamida se utiliza en el tratamiento de: Cáncer testicular recurrente y tumores de células germinales, sarcomas (de tejido blando, sarcoma osteogénico, sarcoma de Ewing), linfoma no Hodgkin, enfermedad de Hodgkin, cáncer de pulmón de células pequeñas y no pequeñas, cáncer vesical, cáncer de cabeza y cuello y cáncer de cuello uterino (Hamilton, 2010).

3.7. Evaluación de daño genético.

La toxicología genética se encarga del estudio de efectos adversos en los procesos hereditarios. Estudios de toxicología genética han dado nacimiento a numerosos procedimientos de prueba, tanto *in vitro* como *in vivo*, diseñados para evaluar los efectos de compuestos químicos en mecanismos genéticos y el consecuente riesgo para organismos, incluyendo humanos (Krishna y Hayashi, 2000).

Los ensayos *in vivo* son especialmente pertinentes para evaluar el riesgo de genotoxicidad, ya que permiten tomar en consideración factores del metabolismo, farmacocinética y los procesos de reparación del ADN y también son útiles para una mayor investigación de los efectos mutagénicos detectados en ensayos *in vitro* de genotoxicidad (Krishna y Hayashi, 2000).

La correlación entre mutagenicidad y carcinogenicidad es cada día más aceptada; se ha demostrado que 157 de los 175 carcinógenos conocidos también son mutágenos (Zúñiga y Gómez, 2006).

Una de las pruebas que se emplean para evaluar el daño genético es la prueba de micronúcleos. La prueba de micronúcleos fue desarrollada por W. Schmid en 1975, quien originalmente la propuso para practicarse en la medula ósea del ratón; posteriormente, la técnica se ha instrumentado en una gran variedad de tejidos y especies, y en la actualidad se le utiliza ampliamente (Krishna y Hayashi, 2000; Zúñiga y Gómez, 2006).

Los micronúcleos son fragmentos de cromosomas o cromosomas completos que espontáneamente o por causa de agentes clastógenos (que rompen cromosomas), o aneuploidógenos (que dañan el huso mitótico), quedan fuera del núcleo durante la mitosis. Los micronúcleos son conocidos en el campo de la hematología como cuerpos de Howell-Jolly y su forma es generalmente redonda o almendrada, con un diámetro que varía desde 0.4 a 1.6 micras. Su formación se basa en que, en la anafase cualquier fragmento cromosómico o cromosoma completo que no posea centrómero o que sufra daño en el huso mitótico, no podrá integrarse a un núcleo por carecer de alguno de estos elementos. Después de la telofase, los cromosomas normales, así como los fragmentos que posean centrómeros, dan origen a los núcleos de las células hijas; sin embargo, los elementos rezagados quedan incluidos en el citoplasma de las células hijas, y una proporción de ellos se transforma en uno o varios núcleos secundarios. Tales núcleos son mucho más pequeños que el núcleo principal, y de ahí su nombre de “micronúcleos” (Fig. 4). Para la realización de la prueba de micronúcleos es indispensable utilizar un tejido en constante división (Zúñiga y Gómez, 2006).

En el ensayo de micronúcleos *in vivo*, la relación eritrocitos policromáticos y eritrocitos normocrómicos (EPC/ ENC) entre los animales de laboratorio tratados con el agente y los animales de control del vehículo, proporciona un índice de citotoxicidad y la genotoxicidad esta dada por un aumento en el número de micronúcleos en los eritrocitos policromáticos (Krishna y Hayashi, 2000).

Dentro de las ventajas de la técnica de micronúcleos se incluyen la facilidad y rapidez, la posibilidad de probar un sólo químico, la abundancia de células analizables en diferentes periodos del ciclo celular (Zúñiga y Gómez, 2006).

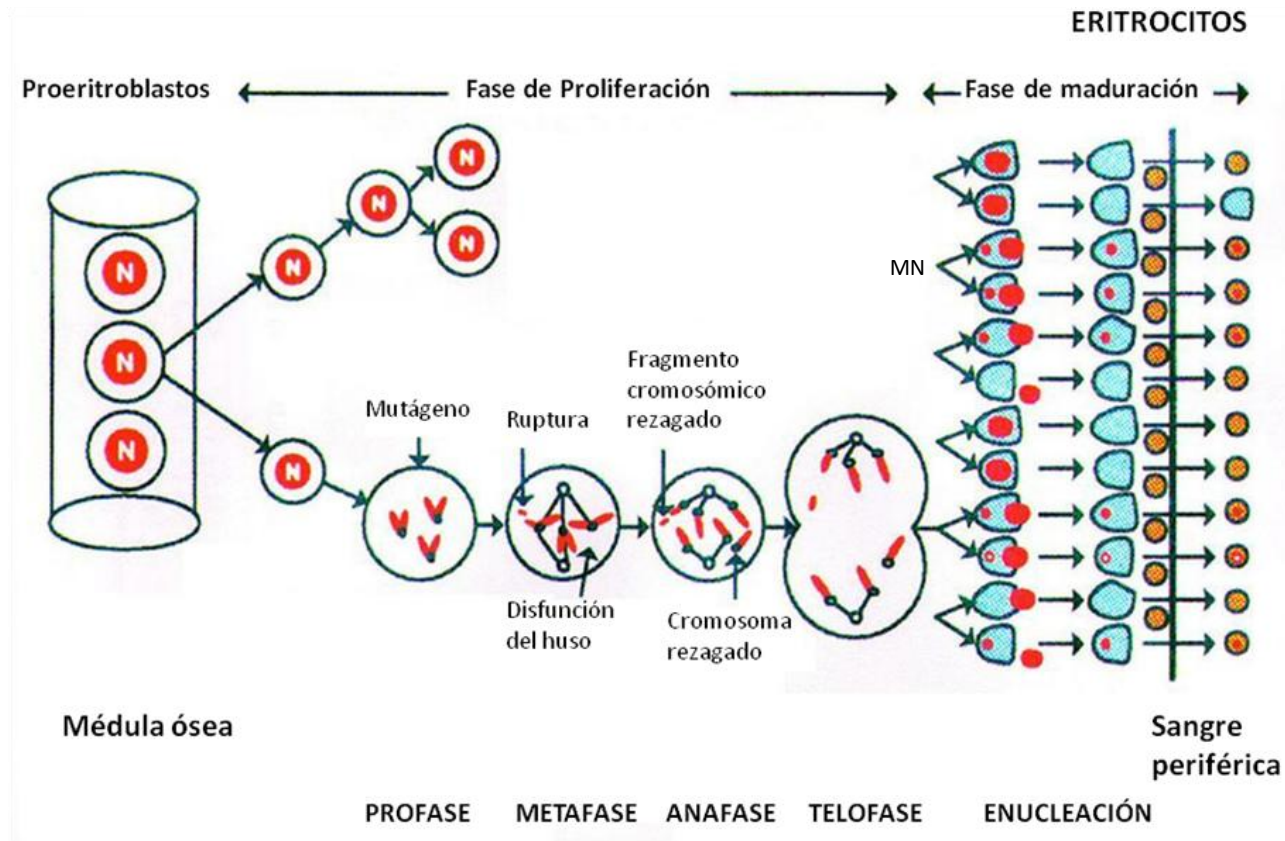


Fig. 4. Proceso de eritropoyesis *in vivo* y formación de micronúcleos (MN) en los eritrocitos (Krishna y Hayashi, 2000).

4. JUSTIFICACIÓN.

Los ácidos anacárdicos son compuestos para los cuales en la literatura se ha informado que poseen actividad biológica diversa; son agentes citotóxicos, poseen actividad antibacteriana, son inhibidores de enzimas y actúan como desacopladores de electrones. Rosas y colaboradores (2006) han sugerido que poseen actividad genoprotectora. Por lo cual en esta investigación se pretende evaluar su efecto sobre el daño genético producido por ifosfamida, un agente antineoplásico administrado en el coctel de fármacos indicado en el tratamiento de cáncer (cáncer testicular recurrente y tumores de células germinales, principalmente) (PLM Refermed, 2009).

5. HIPÓTESIS.

Se ha sugerido que el ácido 6-nonadecil salicílico (A6NDS) posee actividad genoprotectora, por lo cual al ser administrado junto con ifosfamida podría disminuir la frecuencia de eritrocitos policromáticos micronucleados (EPC·MN) producidos por la ifosfamida (agente antineoplásico que induce un aumento en el número de EPC·MN).

6. OBJETIVOS.

General:

- ✓ Evaluar el efecto del ácido 6-nonadecil salicílico sobre el daño genético producido por ifosfamida

Particulares:

- ✓ Evaluar el efecto del ácido 6-nonadecil salicílico sobre la citotoxicidad producida por ifosfamida en sangre periférica de ratón
- ✓ Evaluar el efecto del ácido 6-nonadecil salicílico sobre el daño genético producido por ifosfamida en sangre periférica de ratón

7. MATERIALES Y MÉTODO.

7.1. Recolecta de material biológico.

Zona de recolecta: el material vegetal se recolectó en mayo del 2002, en una zona que se localiza en una selva mediana caducifolia. Geográficamente se ubica en el Cañón del Zopilote en el estado de Guerrero, México.

El descortezamiento se realizó en árboles sanos a una profundidad de 6 a 8 mm sin dañar el cámbium vascular en una superficie de 5 a 20% alrededor del tallo. El material se colocó en bolsas de plástico para su transporte al laboratorio. Se recolectaron también ejemplares para herbario, los cuales se depositaron en el Herbario-Hortorio del Colegio de Postgraduados (CHAPA, C. Catalán 687).

7.2. Obtención del compuesto.

Preparación del extracto.

El A6NDS se aisló del extracto hexánico de la corteza de *Amphipterygium adstringens* siguiendo la metodología propuesta por Rosas *et al.* (2006). El compuesto se identificó por comparación de sus constantes físicas y espectroscópicas (punto de fusión, la resonancia magnética nuclear (^1H) y espectrometría de masas) con las reportadas en la literatura.

7.3. Evaluación de la actividad genotóxica.

Para la prueba se utilizaron 30 ratones machos de la Cepa CD1, los cuales se adquirieron en el Bioterio de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala de la UNAM.

Los ratones se distribuyeron al azar en 6 grupos de 5 ratones cada uno y los tratamientos que recibieron cada uno se enlistan a continuación:

Grupo 1: Control negativo (0.3 mL aceite de maíz)

Grupo 2: Control positivo (ifosfamida 60 mg/kg)

Grupo 3: A6NDS 0.75 mg/kg + ifosfamida 60 mg/kg

Grupo 4: A6NDS 2.5 mg/kg + ifosfamida 60 mg/kg

Grupo 5: A6NDS 5.0 mg/kg + ifosfamida 60 mg/kg

Grupo 6: A6NDS 10.0 mg/kg + ifosfamida 60 mg/kg

Las dosis fueron seleccionadas de acuerdo a la CI_{50} (2.3-5.1 mg/kg) obtenida con el ensayo de la sulforodamina B en cinco líneas de cáncer humano (Rosas *et al.*, 2006). El A6NDS se administró en 0.3 mL aceite de maíz.

Animales: todos los ratones utilizados en los experimentos se trataron de acuerdo a las guías de uso de animales de laboratorio. Los ratones se mantuvieron en cajas de plástico, bajo condiciones controladas de temperatura (20 ± 2 °C), humedad relativa (40 – 60%) y fotoperiodo (12 h luz: 12 h oscuridad), agua y dieta comercial *ad libitum*.

Prueba de micronúcleos: previo a la administración de los compuestos a evaluar, se realizó un frotis sanguíneo, por corte de la porción terminal de la cola del ratón (lectura basal). El compuesto (A6NDS) se administró vía oral y 30 minutos después se administró la ifosfamida disuelta en solución fisiológica por vía intraperitoneal. Después de la administración se hicieron frotis por triplicado a las 24, 48 y 72 h. La administración se hizo vía oral ya que el cuachalalate se utiliza en la medicina tradicional mexicana como una infusión (10-14g /L).

Toma de muestra para los frotis: los frotis se hicieron con sangre periférica obtenida por un corte en la porción terminal de la cola del ratón. Se colocó una gota de sangre sobre un portaobjetos y se extendió con ayuda de otro portaobjetos.

Fijación y tinción: las laminillas se fijaron con metanol absoluto durante cinco minutos y fueron secadas al aire. Transcurrido este tiempo se tiñeron con Giemsa en una solución amortiguadora de fosfato con pH 6.8, durante 20 minutos. Posteriormente se lavaron con agua corriente y se dejaron secar al aire.

La Giemsa se preparó en solución de buffer: agua: Giemsa en proporción 1: 6: 1.

Evaluación: las laminillas se observaron al microscopio, se determinó la frecuencia de eritrocitos policromáticos micronucleados (EPC·MN) en 2000 eritrocitos policromáticos (EPC), lo que permitió evaluar la genotoxicidad. También se determinó la frecuencia de eritrocitos policromáticos y eritrocitos normocrómicos (EPC/ENC), en 2000 eritrocitos, esta relación permitió evaluar la citotoxicidad.

Análisis estadístico: se realizó un análisis de varianza (ANOVA) multifactorial y una prueba comparación de Tukey, utilizando el programa Statgraphics Centurion XV (ver. 15.0.04). El nivel de significancia en todos los análisis fue de $P < 0.05$. Los factores de variación fueron el tiempo y las dosis, las variables dependientes fueron las relaciones EPC/ENC y EPC·MN/2000 EPC.

8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

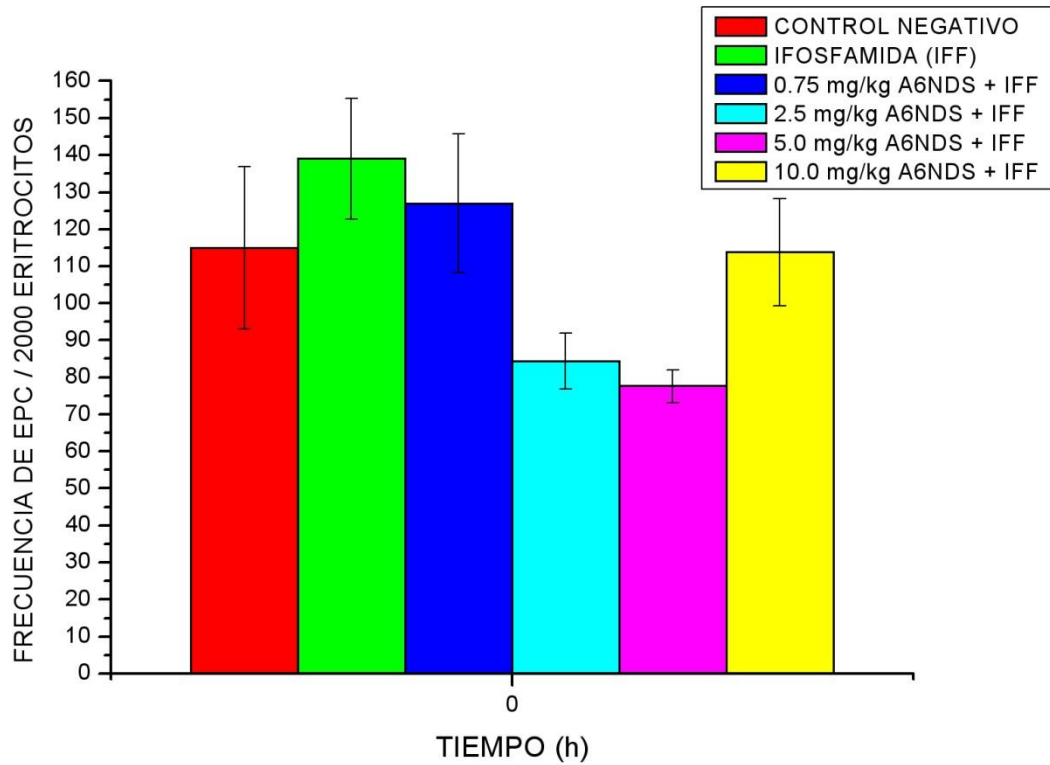
Los resultados obtenidos tras la administración oral del ácido 6-nonadecil salicílico (A6NDS) en las diferentes dosis evaluadas a ratones macho CD1 se muestran en el Cuadro 2.

Cuadro 2. Frecuencia de eritrocitos policromáticos y eritrocitos policromáticos micronucleados (EPC-MN) en ratones CD1 tratados vía oral con el ácido 6-nonadecil salicílico e ifosfamida (A6NDS + IFF).

TIEMPO (h)	DOSIS (mg/kg)	MN/2000 EPC	EPC/2000 eritrocitos
0	0	24.8 ± 2.95	115 ± 21.92
	0.75	21.8 ± 4.5	127 ± 18.66
	2.5	17.8 ± 1.8	84.4 ± 7.58
	5	19.8 ± 3.29	77.6 ± 4.38
	10	30.8 ± 2.43	113.8 ± 14.48
	60(IFF)	28.6 ± 8.82	139 ± 16.34
24	0	23 ± 4.47	65 ± 7.81
	0.75	54.8 ± 7.61*	82.2 ± 10.51
	2.5	50.4 ± 4.73*	80.6 ± 7.58
	5	36.2 ± 3.91	85.4 ± 14.84
	10	36.8 ± 3.65	79 ± 8.8
	60(IFF)	50.6 ± 5.6*	123.8 ± 20.7*
48	0	20.2 ± 4.48	93 ± 9.31
	0.75	78 ± 13.14* ^o	31.2 ± 3.7* ^o
	2.5	72.2 ± 8.26*	47.6 ± 4.88*
	5	67.6 ± 7.13*	40.6 ± 5.21*
	10	53.6 ± 1.8*	35.4 ± 3.69* ^o
	60(IFF)	42.8 ± 2.74	64 ± 5.78*
72	0	21 ± 4.5	86.2 ± 13.72
	0.75	44.6 ± 10.23	17 ± 3.63*
	2.5	14.2 ± 1.82	37 ± 6.42*
	5	10.4 ± 3.28	34.2 ± 2.87*
	10	18 ± 4.49	23.4 ± 3.29*
	60(IFF)	20 ± 6.47	38.6 ± 9.31*

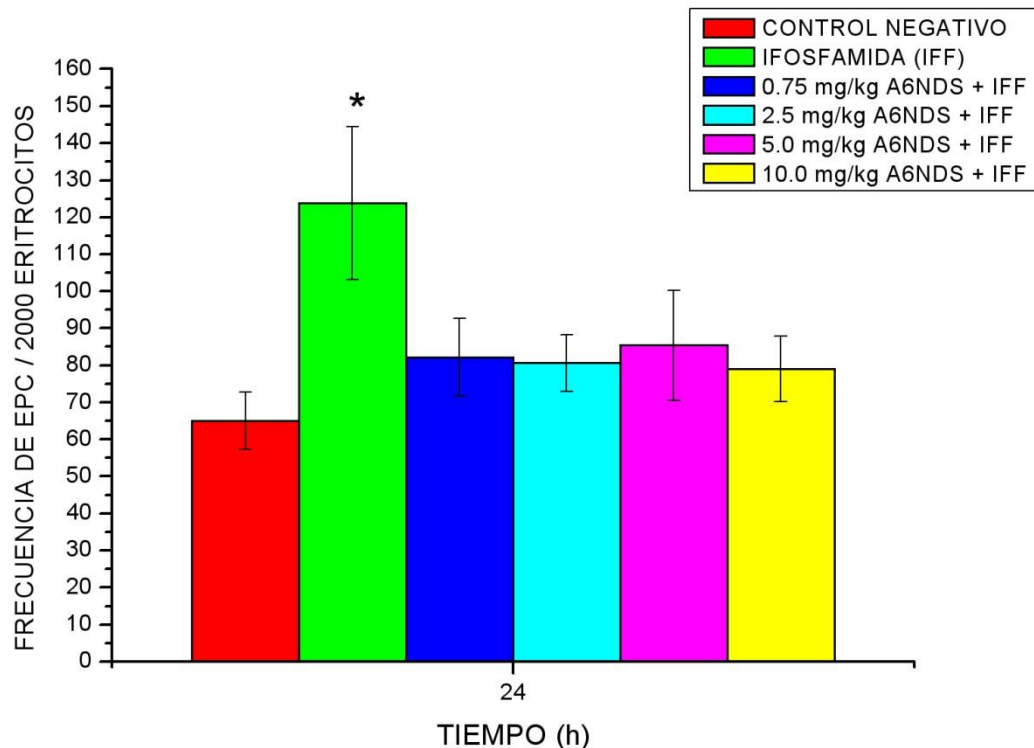
Se muestra la media ± error estándar, los valores marcados con * indican diferencias significativas ($p < 0.05$) con respecto al control negativo (seguido de Tukey). Los valores marcados con ^o indican diferencias significativas ($p < 0.05$) con respecto a ifosfamida (IFF) (seguido de Tukey).

8.1. Actividad citotóxica



Gráfica 1. Efecto del A6NDS + IFF en la frecuencia de eritrocitos policromáticos en 2000 eritrocitos de ratón a 0 h.

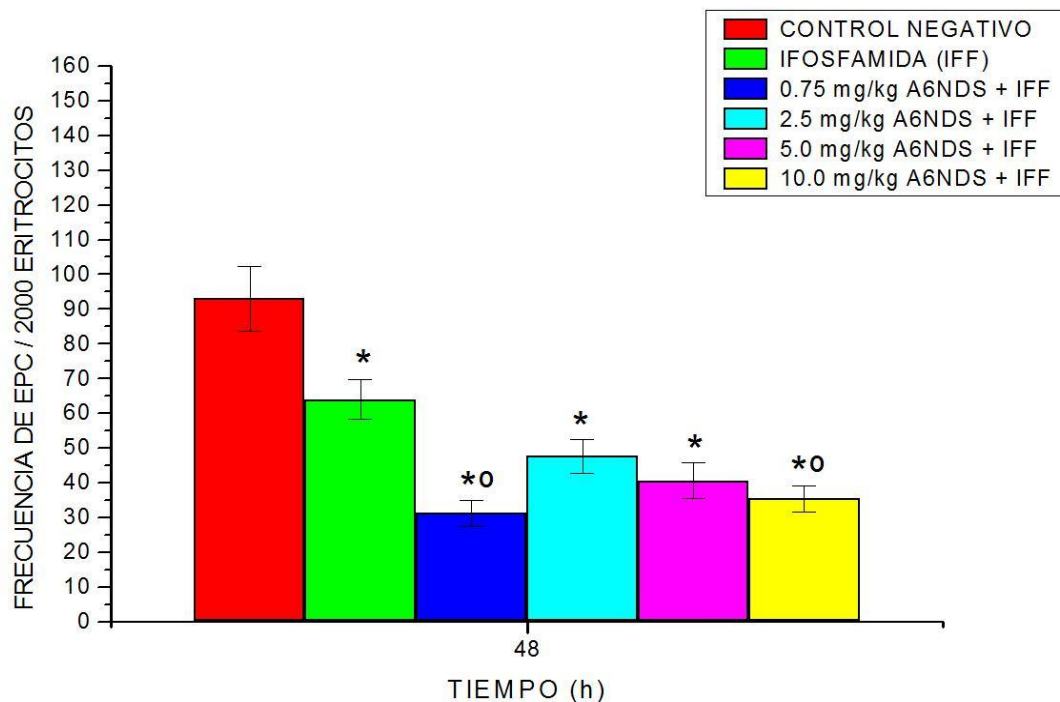
En la gráfica 1 se puede observar que a tiempo cero de observación (basal) no hay diferencia estadística significativa entre los grupos de estudio para la actividad citotóxica.



Gráfica 2. Efecto del A6NDS + IFF en la frecuencia de eritrocitos policromáticos en 2000 eritrocitos de ratón a 24 h. Los valores marcados con * indican diferencias significativas ($p < 0.05$) con respecto al control negativo (seguido de Tukey).

La gráfica 2 muestra que IFF ejerce un efecto citotóxico a partir de las 24 h y su frecuencia se ubica en 123.8 EPC/2000 eritrocitos, el A6NDS + IFF a una dosis de 0.75 mg/kg muestra una frecuencia de 82.2 EPC/2000 eritrocitos al mismo tiempo, es decir que el A6NDS + IFF presenta una actividad citotóxica mayor que cuando solo se administra IFF; a dosis de 2.5, 5 y 10 mg/kg del A6NDS + IFF se observa esta misma tendencia.

Se ha informado que a las 24 h el A6NDS a dosis de 0.75, 2.5, 5 y 10 mg/kg es citotóxico y muestra frecuencias de 76.8, 96.8, 84.4 y 51.2 EPC/2000 eritrocitos respectivamente (Rosas y colaboradores, 2006). Al comparar estos valores con los informados en el presente trabajo (gráfica 2), se puede ver que cuando se administra el A6NDS es más citotóxico que cuando se administra el A6NDS + IFF.



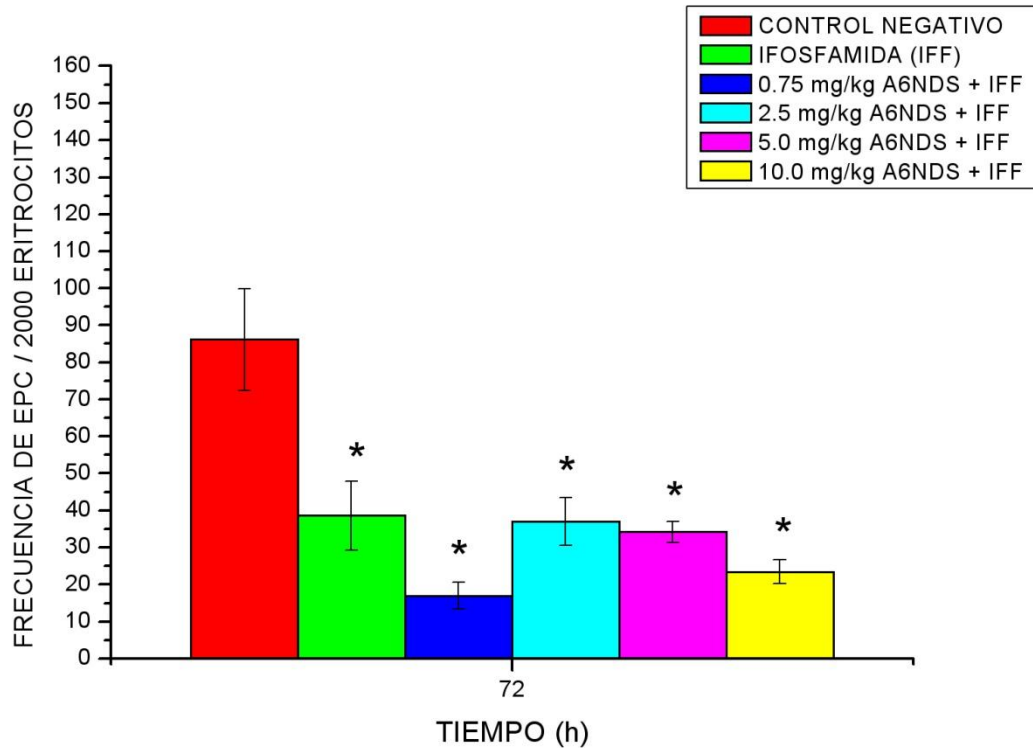
Gráfica 3. Efecto del A6NDS + IFF en la frecuencia de eritrocitos policromáticos en 2000 eritrocitos de ratón a 48 h. Los valores marcados con * indican diferencias significativas ($p < 0.05$) con respecto al control negativo (seguido de Tukey). Los valores marcados con ° indican diferencias significativas ($p < 0.05$) con respecto a ifosfamida (IFF) (seguido de Tukey).

A las 48 h la actividad citotóxica de la IFF muestra una frecuencia de 64 EPC/2000 eritrocitos, a este mismo tiempo el A6NDS + IFF a una dosis de 0.75 mg/kg muestra una frecuencia de 31.2 EPC/2000 eritrocitos y presenta diferencia estadística significativa con respecto a la IFF, es decir que la actividad citotóxica es mayor que cuando se administra IFF sola (gráfica 3); a dosis de 10 mg/kg del A6NDS + IFF se observa esta misma tendencia.

A dosis de 2.5 y 5 mg/kg no se presenta diferencia estadística significativa con respecto a IFF a las 48 h por lo que el A6NDS + IFF mantiene una citotoxicidad similar a la mostrada por IFF.

Rosas y colaboradores (2006) informaron que a las 48 h a una dosis de 0.75, 2.5, 5 y 10 mg/kg el A6NDS es citotóxico y muestra frecuencias de 84.4, 62, 76.8 y 42 EPC/2000 eritrocitos respectivamente, si se comparan estos valores con los

resultados aquí obtenidos a este mismo tiempo (gráfica 3), es claro que cuando se administran el A6NDS + IFF son más citotóxicos que al administrar el compuesto solo, por lo cual se puede decir que el A6NDS potencializa la actividad citotóxica de la IFF (gráfica 3).



Gráfica 4. Efecto del A6NDS + IFF en la frecuencia de eritrocitos policromáticos en 2000 eritrocitos de ratón a 72 h. Los valores marcados con * indican diferencias significativas ($p < 0.05$) con respecto al control negativo (seguido de Tukey).

En la gráfica 4 se observa que la frecuencia de EPC/2000 eritrocitos de IFF y del A6NDS + IFF no presentan diferencia estadística significativa por lo que podría decirse que su actividad citotóxica es similar.

Para el A6NDS se ha informado que la 72 h de haber sido administrado a dosis de 0.75, 2.5, 5 y 10 mg/kg es citotóxico y muestra frecuencias de 54.4, 60.8, 58.4 y 57.2 EPC/2000 eritrocitos respectivamente (Rosas y colaboradores, 2006) por lo cual, comparando estos valores con los informados en el presente trabajo (gráfica

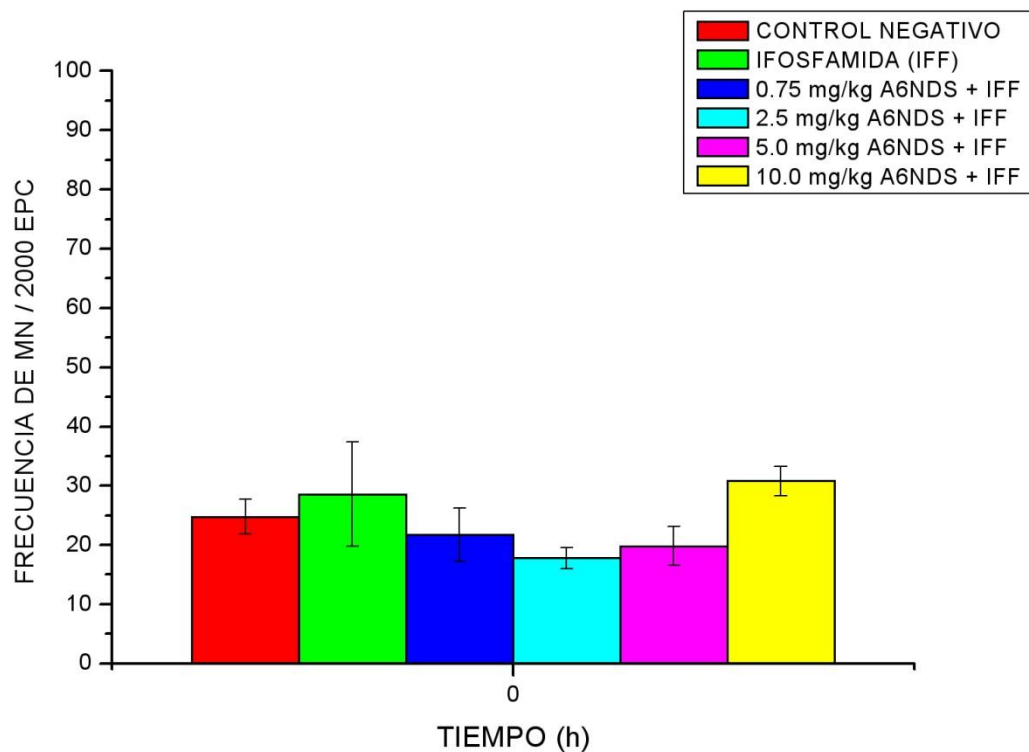
4), se puede observar que al administrarse el A6NDS + IFF son más citotóxicos que al administrar el compuesto solo (gráfica 4).

Es a las 48 h cuando el A6NDS + IFF presentan el mayor efecto sinérgico mostrando diferencia estadística significativa tanto con el control negativo como con IFF. A este mismo tiempo se observó que la dosis de 0.75 mg/kg de A6NDS + IFF presenta un mayor efecto sinérgico que las demás dosis administradas, este mismo efecto de potenciación es similar al que presentan los medicamentos homeopáticos, los cuales mientras más diluidos se administran, más potentes son (Homeopatía general, 2011). Las dosis de 2.5, 5 y 10 mg/kg del A6NDS + IFF presentan un efecto dosisdependiente, es decir, cuanto más aumenta la dosis, mayores son los efectos citotóxicos.

En 1989, Itokawa y colaboradores, reportaron que mientras más largas sean las cadenas de los ácidos anacárdicos se muestra una mayor actividad citotóxica, en los resultados del presente estudio, el A6NDS + IFF exhibió una mayor actividad citotóxica que IFF, esto concuerda con lo informado por Sung y colaboradores (2008) quienes al administrar el ácido 6-pentadecilsalicílico junto con cisplatino y doxorubicina (agentes antineoplásicos) observaron que aumenta el porcentaje de células muertas por apoptosis y que es dicho ácido anacárdico el que induce los efectos apoptóticos en cultivos celulares.

Por otro lado los resultados del análisis indican que todas las dosis evaluadas presentan una reducción significativa en la frecuencia de EPC a partir de las 48 h y hasta las 72 h concordando con lo reportado por Rosas *et al.* (2006), quienes informaron que el A6NDS exhibe actividad citotóxica; e Itokawa *et al.* (1987) quienes informan que los ácidos anacárdicos obtenidos de *G. biloba* mostraron actividad antitumoral al evaluarse en Sarcoma 180 de ratón.

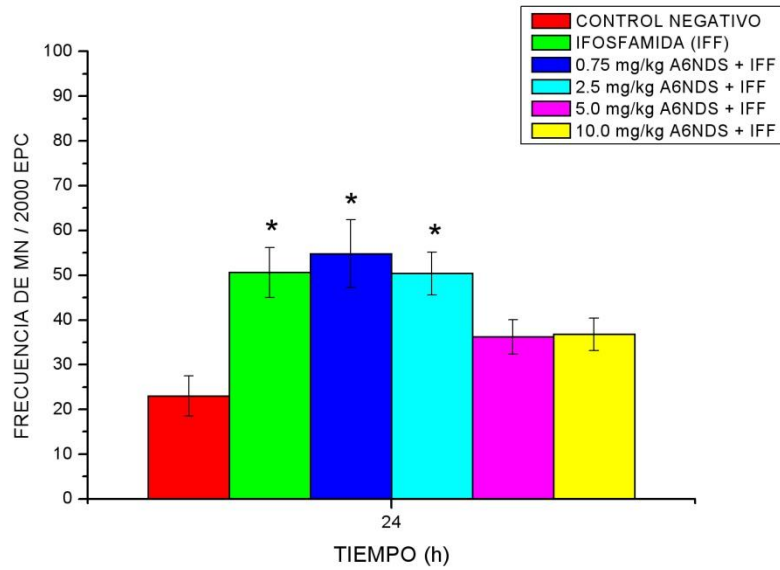
8.2. Actividad genotóxica



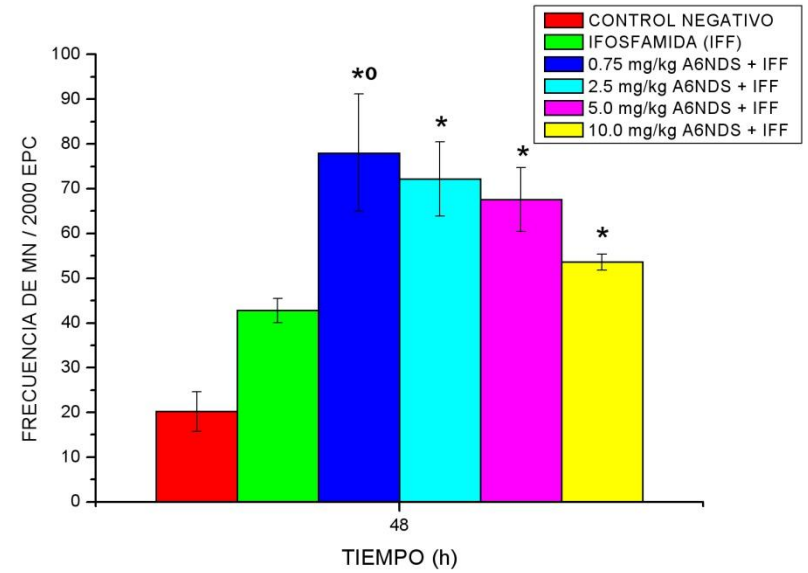
Gráfica 5. Efecto del A6NDS + IFF en la frecuencia de micronúcleos en 2000 eritrocitos policromáticos de ratón a 0 h.

En la gráfica 5 se puede observar que a tiempo cero de observación (basal) no hay diferencia estadística significativa entre los grupos de estudio para la actividad genotóxica.

Efecto del ácido 6-nonadecil salicílico sobre el daño genético producido por ifosfamida.



Gráfica 6. Efecto del A6NDS + IFF en la frecuencia de micronúcleos en 2000 eritrocitos policromáticos de ratón a 24 h. Los valores marcados con * indican diferencias significativas ($p < 0.05$) con respecto al control negativo (seguido de Tukey).

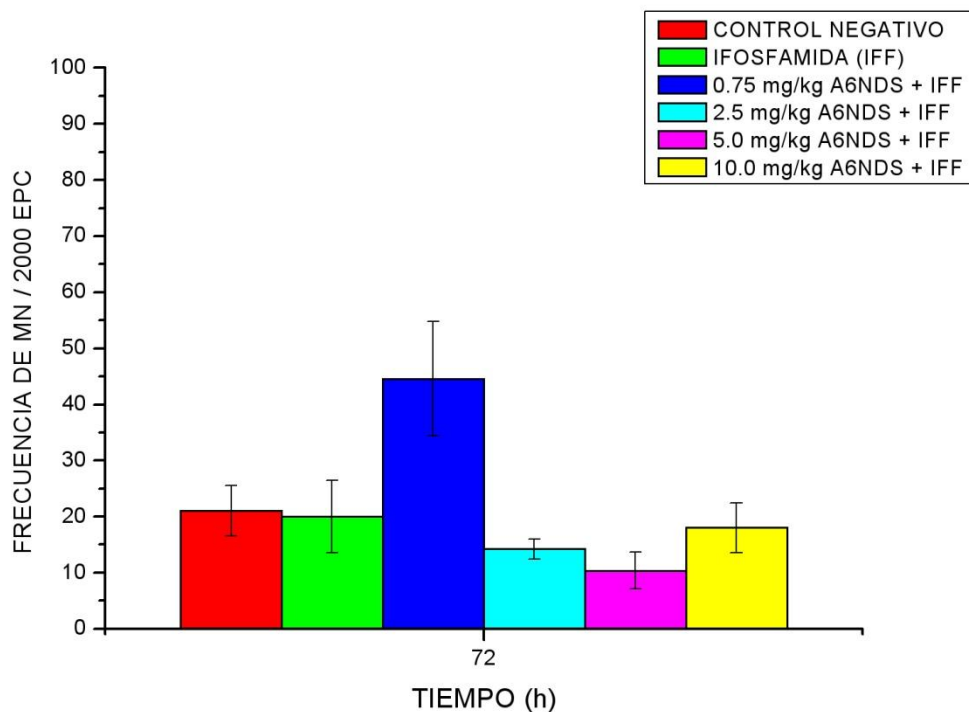


Gráfica 7. Efecto del A6NDS + IFF en la frecuencia de micronúcleos en 2000 eritrocitos policromáticos de ratón a 48 h. Los valores marcados con * indican diferencias significativas ($p < 0.05$) con respecto al control negativo (seguido de Tukey). Los valores marcados con ° indican diferencias significativas ($p < 0.05$) con respecto a ifosfamida (IFF) (seguido de Tukey).

La IFF presentó actividad genotóxica a las 24 h y 48 h con frecuencias de 50.6 y 42.8 MN/ 2000 EPC respectivamente, a estos mismos tiempos, el A6NDS +IFF a una dosis de 0.75 mg/kg muestra frecuencias de 54.8 y 78 MN/2000 EPC respectivamente y mostrando diferencia estadística significativa con respecto a la IFF a las 48 h, es decir que la actividad genotóxica es mayor que cuando se administra la IFF sola (gráfica 6 y 7). A dosis de 2.5, 5 y 10 mg/kg del A6NDS + IFF se observa que el efecto genotóxico producido es inversamente dosisdependiente teniendo mayor efecto a las 48 h, esto es que a dosis más pequeñas el efecto genotóxico es mayor. Asimismo podría decirse que presenta un efecto de potenciación similar a los medicamentos homeopáticos.

Se ha informado que el A6NDS no presenta actividad genotóxica a dosis de 0.75, 2.5 y 5 mg/kg y que a dosis de 10 mg/kg presenta actividad genoprotectora mostrando frecuencias de 4, 3.2, 4 y 0.8 MN/2000 EPC respectivamente a las 24 h, y a las 48 h mostrando frecuencias de 2, 2, 2.4 y 0.8 MN/2000 EPC respectivamente (Rosas y colaboradores, 2006). Al comparar estos valores con los informados en el presente trabajo (gráfica 6 y 7), se puede ver que se potencializa el daño genético producido por la IFF cuando se administran el A6NDS + IFF.

Las diferentes dosis administradas de A6NDS + IFF mostraron un comportamiento dosis dependiente inverso, es decir que la dosis de 0.75 mg/kg mostró un mayor efecto genotóxico llegando a presentar diferencia estadísticamente significativa tanto con el control negativo como con IFF.



Gráfica 8. Efecto del A6NDS + IFF en la frecuencia de micronúcleos en 2000 eritrocitos policromáticos de ratón a 72 h.

A las 72 h no hay diferencia estadística significativa entre los tratamientos (gráfica 8).

Rosas y colaboradores (2006) informaron que una dosis de 10 mg/kg el A6NDS es genoprotector a partir de la 24 y hasta las 72 h, resultados que contrastan con los observados en esta investigación, debido a que a ninguna de las dosis ni tiempos evaluados se observa efecto genoprotector, por el contrario se observa que al administrar el A6NDS + IFF se potencializa la actividad genotóxica (gráfica 8).

Existen pocos trabajos sobre el efecto de los ácidos anacárdicos sobre el daño genético y son aun menos los trabajos que evalúan los efectos genotóxicos producidos sobre agentes antineoplásicos por lo que es difícil hacer una comparación con los resultados obtenidos en el presente trabajo.

La administración de A6NDS + IFF a las diferentes dosis y tiempos de evaluación mostraron frecuencias de EPC·MN superiores a las frecuencias del control negativo y de la IFF.

En la literatura se informa que el extracto hexánico presenta efectos genoprotectores a dosis de 1500 mg/kg inhibiendo la formación de micronúcleos producidos por ifosfamida en un 90% (Martínez y Flores, 2003), al realizar las pruebas de un solo compuesto como lo es el A6NDS y observar que la frecuencia de micronúcleos que se presenta es mayor que la ifosfamida, podemos pensar que tal vez sea otro compuesto presente en el extracto hexánico el que produce dicho efecto genoprotector.

Hoy en día, la necesidad de nuevos agentes antitumorales aún existe, debido a que estos se utilizan por largo tiempo y a los indeseables efectos secundarios. Parece que las plantas consumidas por el hombre puede ser una buena fuente de nuevos agentes antitumorales, con esto en mente, se han analizado nuevos agentes de plantas que se han consumido continuamente por muchas personas durante muchos años (Kubo *et al.*, 1993). Por lo que es necesario continuar con los estudios de los demás compuestos presentes en el extracto hexánico.

9. CONCLUSIONES.

De acuerdo con los resultados obtenidos se puede concluir que:

El ácido 6-nonadecil salicílico potencializa la actividad citotóxica de ifosfamida en la sangre periférica de ratones de la cepa CD1.

La frecuencia de micronúcleos presentes cuando se administra el ácido 6-nonadecil salicílico junto con la ifosfamida es mayor que la frecuencia de EPC-MN que produce el agente antineoplásico, por lo que el ácido 6-nonadecil salicílico no protege contra el daño genético producido por la ifosfamida.

10. SUGERENCIAS.

Realizar una prueba de dosis únicas seguido de dosis de mantenimiento para evaluar el efecto del ácido 6-nonadecil salicílico sobre la actividad genotóxica de la ifosfamida.

Determinar la DL_{50} del ácido 6-nonadecil salicílico y realizar el experimento con dosis establecidas en base a la DL_{50} .

Evaluar la actividad citotóxica y genotóxica de los demás compuestos presentes en el extracto hexánico del cuachalalate.

11. LITERATURA CITADA.

- American Cancer Society. Cancer Facts & Figures 2009. Atlanta: American Cancer Society; (2009) 1-68.
- Akerele, O., 1993. Nature's medicinal bounty: don't throw it away. World Health Forum 14, 390-395.
- Ankli, A., M. Heinrich, P. Bork, L. Wolfram, P. Bauerfeind, R. Brun, C. Schmid, C. Weiss, R. Bruggisser, J. Gertsch, M. Wasescha, O. Sticher. 2002. Yucatec Mayan medicinal plants: evaluation based on indigenous uses. J. Ethnopharm. 79: 43–52.
- Argueta, V. A., L. Cano, M. Rodarte. 1994. Atlas de las plantas de la medicina tradicional mexicana. Instituto indigenista. México. pp. 542-543.
- Benítez Y., J. 1998. Evaluación farmacológica del efecto gastroprotector de los triterpenoides de la corteza de cuachalalate. Tesis de Licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza. UNAM. México, D.F. pp. 90-95.
- Burgos N., K., P. Peña R., M. Valenzuela C., P. Bórquez M. 2009. Segundos cánceres primarios. Cuad. Cir. 23: 24-27.
- Calixto, J. B. 2005. Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin America. A personal view. J. Ethnopharm. 100: 131–134.
- Castillo-Juárez I., F. Rivero-Cruz, H. Celis, I. Romero. 2007. Anti-*Helicobacter pylori* activity of anacardic acids from *Amphipterygium adstringens*. J. Ethnopharm. 114: 72–77.
- Chabner, B. A., P. C. Amrein, B. J. Druker, M. D., Michaelson, C. S. Mitsiades, P. E. Goss, D. P. Ryan, S. Ramachandra, P. G. Richardson, J. G. Supko, W. H. Wilson. 2006. Fármacos antineoplásicos. En Goodman & Gilman. Las

- bases farmacológicas de la terapéutica. Parker, K. L., J. S. Lazo, L. L. Brunton (eds). 11ª ed. McGraw-Hill Interamericana. México. pp. 2176.
- Giner-Larza, E. M., S. Mañez, R. M. Giner, M. C. Recio, J. M. Prieto, M. Cerdá-Nicolás, J. L. Ríos. 2002. Anti-inflammatory triterpenes from *Pistacia terebintus* galls. *Planta Med.* (68): 311-315.
- González E., E., G. F. McKenna, J. N. Delgado. 1962. Anticancer activity of *Amphipterygium adstringens*. *J. Pharmacol. Sci.* (51): 901-905.
- Hamilton, S. 2010. Medicinas de Quimioterapia. IFOSFAMIDA. Fecha de consulta: 4/02/2011. Disponible en: http://www.chemocare.com/es/bio_es/ifosfamida_ES.asp
- Heinrich, M., A. Ankli, B. Frei, C. Weimann, O. Sticher. 1998. Medicinal Plants in Mexico: Healer's Consensus and Cultural importance. *Soc. Sci. Med.* Vol. 47, No. 11, pp. 1859-1871.
- Homeopatía general. 2011. El proceso de dilución. Fecha de consulta: 23/09/2011. Disponible en: <http://www.homeopatiageneral.com/>
- Itokawa, H., N. Totsuka, K. Nakahara, K. Takeya, J.P. Lepoittevin, Y. Asakawa. 1987. Antitumor principles from *Ginkgo biloba*. *Chem. Pharm. Bull.* 35: 3016-3020.
- Itokawa, H., N. Totsuka, K. Nakahara, M. Maezuru, K. Takeya, M. Kondo, M. Inamatsu, H. Morita. 1989. A quantitative structure-activity relationship for antitumor activity of long-chain phenols from *Ginkgo biloba* L. *Chem. Pharm. Bull.* 37 (7): 1619-1621.
- Krishna, G., Hayashi, M. 2000. *In vivo* rodent micronucleus assay protocol, conduct and data interpretation. *Mutat. Res.* 455: 155-166.
- Kubo, I., M. Ochi, P. C. Vieira, S. Komatsu. 1993. Antitumor Agents from the Cashew (*Anacardium occidentale*) Apple Juice. *J. Agric. Food Chem.*, Vol. 41, No. 6, pp 1012-1015.

- Makino, M., T. Motegi, Y. Fijimoto. 2004. Tirucallane-type triterpenes from *Juliana adstringens*. *Phytochem.* 65:891-896.
- Martínez, R. E., G. R. Flores. 2003. Estudio de la acción anticlastogénica del cuachalalate (*Amphipterygium adstringens*) sobre la inducción de micronúcleos producidos por ifosfamida. Tesis de Licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. UNAM. México, D.F. pp. 32-50.
- National Cancer Institute. 2010. Entendiendo al Cáncer y Temas Relacionados: al Cáncer. pp. 61. Fecha de consulta: 4/02/2011. Disponible en: <http://www.cancer.gov/espanol/cancer/entendiendo/cancer/allpages>
- Navarrete C., A. 1982. Estudio químico y pruebas farmacológicas preliminares de la corteza de *Juliana adstringens* (Cuachalalate). Tesis de Licenciatura. Escuela Nacional de Estudios Profesionales Zaragoza. UNAM. México, D.F. pp. 52-53.
- Navarrete C., A., R. Mata, J. Delgado. 1989. Alkylsuccinic acids from *Amphipterygium adstringens*. *Planta Med.* 55: 579.
- Olivera-Ortega, A.G., M. Soto-Hernández, M. Martínez-Vázquez, T. Terrazas-Salgado, F. Solares-Arenas. 1999. Phytochemical study of cuachalalate (*Amphipterygium adstringens* Schiede ex Schlecht). *J. Ethnopharm.* 68: 109–113.
- Oviedo-Chávez, I., T. Ramírez-Apan, M. Soto-Hernández, M. Martínez-Vázquez. 2004. Principles of the bark of *Amphipterygium adstringens* (Julianaceae) with anti-inflammatory activity. *Phytomedicine* 11: 436–445.
- Parslow, T.G., D.P. Stites, A.I. Terr, J.B. Imboden. 2002. Inmunología básica y clínica. 10ª ed., El Manual Moderno. México. pp. 1026.
- PLM Refermed. 2009. Ifosfamida. En Diccionario de Especialidades Farmacéuticas. Edición 55. México D.F.: 722, 724.

- Rojas A., M. 2001. Cuachalalate. Tlahui-Medic. No. 11, I/2000. Fecha de consulta: 7/02/2011. Disponible en: <http://www.tlahui.com/medic/medic11/cuachal1.htm>
- Rosas A., H. 2005. Estudio químico-biológico de *Amphipterygium adstringens* Schiede ex Schlecht. Tesis Doctoral. Colegio de Postgraduados. Estado de México, México. pp. 110.
- Rosas A., H., M. Domínguez R., S. Díaz B. A., M. Soto H., M. Martínez V., T. Terrazas, G. Valencia del Toro. 2006. Effect of 6-nonadecyl salicylic acid and its methyl ester on the induction of micronuclei in polychromatic erythrocytes in mouse peripheral blood. *Mutat. Res.* 609: 43–46.
- Sung, B., M. K. Pandey, K. S. Ahn, T. Yi, M. M. Chaturvedi, M. Liu, B. B. Aggarwal. 2008. Anacardic acid (6-nonadecyl salicylic acid), an inhibitor of histone acetyltransferase, suppresses expression of nuclear factor- κ B-regulated gene products involved in cell survival, proliferation, invasion, and inflammation through inhibition of the inhibitory subunit of nuclear factor- κ B kinase, leading to potentiation of apoptosis. *Blood* 111 (10): 4880-4891.
- Velázquez, C., F. Calzada, J. Torres, F. González, G. Ceballos. 2006. Antisecretory activity of plants used to treat gastrointestinal disorders in Mexico. *J. Ethnopharm.* 103: 66–70.
- Zúñiga González, G. M., B. C. Gómez Meda. 2006. La prueba de micronúcleos. *La Ciencia y el Hombre.* Vol. 19, No. 1.

12. ANEXOS.

Frecuencias de eritrocitos policromáticos (EPC) y eritrocitos policromáticos micronucleados (EPC-MN) en ratones tratados oralmente con el ácido 6-nonadecil salicílico (Rosas *et al.*, 2006).

Treatment	Time of analysis (hours after the administration of drug)	Dose (mg/kg)	MNPCEs/1000 PCEs ^a	PCEs/NCEs × 1000 erythrocytes ^a
6NDSA (administered in 0.3 mL corn oil)	0	0.75	1.8 ± 0.73	43.4 ± 0.6
		2.5	1.6 ± 0.67	48.4 ± 6.3
		5.0	1.2 ± 0.37	47.6 ± 2.3
		10	1.2 ± 0.58	39.6 ± 5.0
		60 (IFF)	1.4 ± 0.24	51.6 ± 4.8
		0.75	2.0 ± 0.54	38.4 ± 3.0
	24	2.5	1.6 ± 0.67	48.4 ± 6.3
		5.0	2.0 ± 0.54	42.2 ± 2.9
		10	0.4 ± 0.24	25.6 ± 5.0*
		60 (IFF)	4.0 ± 0.54	44.4 ± 0.9
		0.75	1.0 ± 0.31	42.2 ± 4.1
		2.5	1.0 ± 0.44	31.0 ± 3.1
	48	5.0	1.2 ± 0.54	38.4 ± 3.2
		10	0.4 ± 0.24	21.0 ± 1.9*
		60 (IFF)	6.6 ± 0.24	43.0 ± 2.12
		0.75	1.0 ± 0.77	27.2 ± 1.7*
		2.5	2.2 ± 0.58	30.4 ± 6.4*
		5.0	1.2 ± 0.54	29.2 ± 7.3*
	72	10	0.4 ± 0.24	28.6 ± 1.6*
		60 (IFF)	4.8 ± 0.20	42.2 ± 1.5

Los valores marcados con * son significativamente diferentes ($p < 0,05$) con respecto a su control negativo.

Preparación de la solución amortiguadora de fosfatos 0.3 M, pH 6.8 para la tinción con Giemsa

(proporción 3A:2B)

Solución A: 40.827 g de KH_2PO_4 se disuelven en 1000 mL de agua destilada.

Solución B: 42.588 g de Na_2HPO_4 se disuelven en 1000 mL de agua destilada.

Análisis estadístico. Statgraphics Centurion XV versión 15.0.04

One-Way ANOVA - Citotoxicidad by Concentración (Tiempo=0)

Analysis Summary

Dependent variable: Citotoxicidad
Factor: Concentración
Selection variable: Tiempo=0

Number of observations: 30
Number of levels: 6

Summary Statistics for Citotoxicidad

Concentración	Count	Average	Variance	Standard deviation	Standard error
0	5	115.0	2404.5	49.0357	21.9294
0.75	5	127.0	1742.0	41.7373	18.6655
2.5	5	84.4	287.3	16.9499	7.58024
5	5	77.6	96.3	9.81326	4.38862
10	5	113.8	1049.7	32.3991	14.4893
60	5	139.0	1336.0	36.5513	16.3463
Total	30	109.467	1449.22	38.0687	6.95035

Multiple Range Tests for Citotoxicidad by Concentración

Method: 95.0 percent Tukey HSD

Concentración	Count	Mean	Homogeneous Groups
5	5	77.6	X
2.5	5	84.4	X
10	5	113.8	X
0	5	115.0	X
0.75	5	127.0	X
60	5	139.0	X

One-Way ANOVA - Citotoxicidad by Concentración (Tiempo=24)

Analysis Summary

Dependent variable: Citotoxicidad
Factor: Concentración
Selection variable: Tiempo=24

Number of observations: 30
Number of levels: 6

Summary Statistics for Citotoxicidad

Concentración	Count	Average	Variance	Standard deviation	Standard error
0	5	65.0	305.5	17.4786	7.81665
0.75	5	82.2	552.7	23.5096	10.5138
2.5	5	80.6	287.3	16.9499	7.58024
5	5	85.4	1102.3	33.2009	14.8479
10	5	79.0	387.5	19.685	8.80341
60	5	123.8	2143.7	46.3001	20.706
Total	30	86.0	997.586	31.5846	5.76653

Multiple Range Tests for Citotoxicidad by Concentración

Method: 95.0 percent Tukey HSD

Concentración	Count	Mean	Homogeneous Groups
0	5	65.0	X
10	5	79.0	XX
2.5	5	80.6	XX
0.75	5	82.2	XX
5	5	85.4	XX
60	5	123.8	X

Efecto del ácido 6-nonadecil salicílico sobre el daño genético producido por ifosfamida.

One-Way ANOVA - Citotoxicidad by Concentración (Tiempo=48)

Analysis Summary

Dependent variable: Citotoxicidad
 Factor: Concentración
 Selection variable: Tiempo=48

Number of observations: 30
 Number of levels: 6

Summary Statistics for Citotoxicidad

Concentración	Count	Average	Variance	Standard deviation	Standard error
0	5	93.0	433.5	20.8207	9.31128
0.75	5	31.2	68.7	8.28855	3.70675
2.5	5	47.6	119.3	10.9225	4.88467
5	5	40.6	135.8	11.6533	5.21153
10	5	35.4	68.3	8.26438	3.69594
60	5	64.0	167.5	12.9422	5.78792
Total	30	51.9667	599.482	24.4843	4.4702

Multiple Range Tests for Citotoxicidad by Concentración

Method: 95.0 percent Tukey HSD

Concentración	Count	Mean	Homogeneous Groups
0.75	5	31.2	X
10	5	35.4	X
5	5	40.6	XX
2.5	5	47.6	XX
60	5	64.0	X
0	5	93.0	X

One-Way ANOVA - Citotoxicidad by Concentración (Tiempo=72)

Analysis Summary

Dependent variable: Citotoxicidad
Factor: Concentración
Selection variable: Tiempo=72

Number of observations: 30
Number of levels: 6

Summary Statistics for Citotoxicidad

Concentración	Count	Average	Variance	Standard deviation	Standard error
0	5	86.2	941.7	30.6871	13.7237
0.75	5	17.0	66.0	8.12404	3.63318
2.5	5	37.0	206.5	14.3701	6.42651
5	5	34.2	41.2	6.41872	2.87054
10	5	23.4	54.3	7.36885	3.29545
60	5	38.6	433.8	20.8279	9.3145
Total	30	39.4	754.524	27.4686	5.01506

Multiple Range Tests for Citotoxicidad by Concentración

Method: 95.0 percent Tukey HSD

Concentración	Count	Mean	Homogeneous Groups
0.75	5	17.0	X
10	5	23.4	X
5	5	34.2	X
2.5	5	37.0	X
60	5	38.6	X
0	5	86.2	X

Efecto del ácido 6-nonadecil salicílico sobre el daño genético producido por ifosfamida.

One-Way ANOVA - Genotoxicidad by Concentración (Tiempo=0)

Analysis Summary

Dependent variable: Genotoxicidad
 Factor: Concentración
 Selection variable: Tiempo=0

Number of observations: 30
 Number of levels: 6

Summary Statistics for Genotoxicidad

Concentración	Count	Average	Variance	Standard deviation	Standard error
0	5	24.8	43.7	6.6106	2.95635
0.75	5	21.8	101.7	10.0846	4.50999
2.5	5	17.8	16.2	4.02492	1.8
5	5	19.8	54.2	7.36206	3.29242
10	5	30.8	29.7	5.44977	2.43721
60	5	28.6	389.3	19.7307	8.82383
Total	30	23.9333	109.789	10.478	1.91301

Multiple Range Tests for Genotoxicidad by Concentración

Method: 95.0 percent Tukey HSD

Concentración	Count	Mean	Homogeneous Groups
2.5	5	17.8	X
5	5	19.8	X
0.75	5	21.8	X
0	5	24.8	X
60	5	28.6	X
10	5	30.8	X

One-Way ANOVA - Genotoxicidad by Concentración (Tiempo=24)

Analysis Summary

Dependent variable: Genotoxicidad
Factor: Concentración
Selection variable: Tiempo=24

Number of observations: 30
Number of levels: 6

Summary Statistics for Genotoxicidad

Concentración	Count	Average	Variance	Standard deviation	Standard error
0	5	23.0	100.0	10.0	4.47214
0.75	5	54.8	289.7	17.0206	7.61183
2.5	5	50.4	112.3	10.5972	4.7392
5	5	36.2	76.7	8.75785	3.91663
10	5	36.8	66.7	8.16701	3.6524
60	5	50.6	157.3	12.5419	5.60892
Total	30	41.9667	236.585	15.3813	2.80823

Multiple Range Tests for Genotoxicidad by Concentración

Method: 95.0 percent Tukey HSD

Concentración	Count	Mean	Homogeneous Groups
0	5	23.0	X
5	5	36.2	XX
10	5	36.8	XX
2.5	5	50.4	X
60	5	50.6	X
0.75	5	54.8	X

Efecto del ácido 6-nonadecil salicílico sobre el daño genético producido por ifosfamida.

One-Way ANOVA - Genotoxicidad by Concentración (Tiempo=48)

Analysis Summary

Dependent variable: Genotoxicidad
 Factor: Concentración
 Selection variable: Tiempo=48

Number of observations: 30
 Number of levels: 6

Summary Statistics for Genotoxicidad

Concentración	Count	Average	Variance	Standard deviation	Standard error
0	5	20.2	100.7	10.0349	4.48776
0.75	5	78.0	864.5	29.4024	13.1491
2.5	5	72.2	341.7	18.4851	8.2668
5	5	67.6	254.8	15.9625	7.13863
10	5	53.6	16.3	4.03733	1.80555
60	5	42.8	37.7	6.14003	2.74591
Total	30	55.7333	626.685	25.0337	4.5705

Multiple Range Tests for Genotoxicidad by Concentración

Method: 95.0 percent Tukey HSD

Concentración	Count	Mean	Homogeneous Groups
0	5	20.2	X
60	5	42.8	XX
10	5	53.6	XX
5	5	67.6	XX
2.5	5	72.2	XX
0.75	5	78.0	X

One-Way ANOVA - Genotoxicidad by Concentración (Tiempo=72)

Analysis Summary

Dependent variable: Genotoxicidad
Factor: Concentración
Selection variable: Tiempo=72

Number of observations: 30
Number of levels: 6

Summary Statistics for Genotoxicidad

Concentración	Count	Average	Variance	Standard deviation	Standard error
0	5	21.0	101.5	10.0747	4.50555
0.75	5	44.6	523.3	22.8758	10.2303
2.5	5	14.2	16.7	4.08656	1.82757
5	5	10.4	53.8	7.33485	3.28024
10	5	18.0	101.0	10.0499	4.49444
60	5	20.0	209.5	14.4741	6.47302
Total	30	21.3667	263.689	16.2385	2.96473

Multiple Range Tests for Genotoxicidad by Concentración

Method: 95.0 percent Tukey HSD

Concentración	Count	Mean	Homogeneous Groups
5	5	10.4	X
2.5	5	14.2	X
10	5	18.0	X
60	5	20.0	XX
0	5	21.0	XX
0.75	5	44.6	X
