



UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA

ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD GENOTÓXICA DE LAS
MOLÉCULAS: ACETATO DE B-AMIRINA Y
DEHIDROLEUCODINA, MEDIANTE EL ENSAYO CBMN EN
LINFOCITOS HUMANOS**

**Previo a la obtención del título
de Bioquímico Farmacéutico**

AUTOR:

Henry Fernando Cabrera Japón

DIRECTORA:

Dra. Natalia Bailón Moscoso

LOJA- ECUADOR

2010

Dra.
Natalia Bailón Moscoso

DIRECTORA DE TESIS

CERTIFICA:

Que una vez revisado el trabajo de investigación realizado por el Sr. Henry Fernando Cabrera Japón, previo a la obtención del título de BIOQUÍMICO FARMACÉUTICO, se autoriza su presentación final para la evaluación correspondiente.

Loja, febrero 2010.

Dra. Natalia Bailón Moscoso
DIRECTORA

AUTORÍA

Los conceptos, ideas y resultados vertidos en el desarrollo del presente trabajo de investigación son absoluta responsabilidad de su autor.

Henry Fernando Cabrera Japón

DEDICATORIA

A Dios:
Por ayudarme a culminar una
etapa más en mi vida.

A mis padres y hermanos:
Por el apoyo incondicional y su amor
brindado durante toda mi vida.

A mis sobrinos:
Por ser mi motivo de superación.

AGRADECIMIENTO

A la Universidad Técnica Particular de Loja, en la persona del Dr. Ph.D. Luis Miguel Romero Fernández, por haberme recibido durante mi vida universitaria y permitirme ser parte de la familia utepelina e instruirme para buscar la verdad a través de la ciencia y llegar a ser útil a la sociedad.

Al Centro de Biología Celular y Molecular, por brindarme la oportunidad de realizar el proyecto de fin de carrera y permitirme desarrollar mis aptitudes para enfrentarme a la vida profesional.

A la Escuela de Bioquímica y Farmacia, bajo la Dirección de la Dra. Paula Torres y la Bioquímica Gabriela Cevallos, por su constante dedicación para formar profesionales competentes y con calidad humana. A mis maestros que con sus sabios conocimientos me formaron académica y personalmente.

A la Dra. Natalia Bailón Moscoso, por su dirección en la presente Tesis y su permanente apoyo en el laboratorio. Gracias por sus sabios consejos, por su dedicación y comprensión, por todo esto, mi más profunda gratitud.

A la Bioquímica Diana Herrera, por su tutela y apoyo en la realización de la tesis.

A Javier Villacís por su grande y valiosa cooperación para la culminación de este trabajo.

A mi familia por todo el cariño y comprensión brindados durante mi vida universitaria, por todos los gratos momentos compartidos y por el apoyo recibido en cada etapa de mi vida.

A mis compañeros de aula y del Área de Genética Toxicológica, por estar siempre dispuestos a compartir sus conocimientos y prestar su ayuda.

CONTRATO DE CESIÓN DE DERECHO DE TESIS

Yo, Henry Fernando Cabrera Japón, declaro ser autor del presente trabajo y eximo expresamente a la Universidad Técnica Particular de Loja y a sus representantes legales de posibles reclamos o acciones legales.

Adicionalmente declaro conocer y aceptar la disposición del artículo 67 del Estatuto Orgánico de la Universidad Técnica Particular de Loja que en su parte pertinente textualmente dice “Forman parte del patrimonio de la Universidad la propiedad intelectual de investigadores, trabajos científicos o técnicos o tesis de grado que se realicen a través, o con el apoyo financiero, académico o institucional (operativo) de la Universidad”.

Henry F. Cabrera J.
Tesista

Dra. Natalia Bailón Moscoso
Directora de Tesis

ÍNDICE DE CONTENIDOS

CERTIFICACIÓN.....	II
AUTORÍA.....	III
DEDICATORIA.....	IV
AGRADECIMIENTO.....	V
CONTRATO DE CESIÓN DE DERECHOS DE TESIS.....	VI
RESUMEN.....	X
ABSTRACT.....	XI
OBJETIVOS.....	XII
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. GENOTOXICIDAD.....	1
1.1.1. Definición.....	1
1.1.2. NATURALEZA DE LOS MUTÁGENOS.....	1
1.1.2.1. Mutágenos químicos.....	1
1.1.2.2. Mutágenos físicos.....	2
1.1.2.3. Mutágenos biológicos.....	2
1.1.3. Pruebas para detectar las alteraciones genéticas.....	3
1.2. ENSAYO DE MICRONÚCLEOS CON BLOQUEO DE LA CITOCINESIS (CBMN).....	5
1.2.1. Introducción.....	5
1.2.2. Criterios para identificar células binucleadas.....	10
1.2.3. Criterios para identificar micronúcleos.....	11
1.2.4. Obtención del Índice de División Nuclear.....	12
1.3. PRINCIPIOS ACTIVOS DE ORIGEN VEGETAL.....	14
1.3.1. Introducción.....	14
1.3.2. Triterpenos.....	15
1.3.2.1. Acetato de β -amirina.....	17
1.3.3. Lactonas sesquiterpénicas.....	19
1.3.3.1. Dehidroleucodina.....	21
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	24
2.1. Control positivo.....	24
2.2. Control negativo.....	24

2.3. Obtención de las moléculas Acetato de β -amirina y Dehidroleucodina.....	24
2.4. Modelo biológico.....	24
2.5. Viabilidad celular	25
2.6. Evaluación del efecto citostático de las moléculas Acetato de β -amirina y Dehidroleucodina.....	26
2.6.1. Siembra	26
2.6.2. Cosecha	27
2.6.3. Tinción.....	28
2.7. Evaluación del efecto genotóxico de las moléculas Acetato de β -amirina y Dehidroleucodina.....	29
2.8. Diagrama del ensayo de micronúcleos	30
2.9. Análisis estadístico.....	30
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	31
4. CONCLUSIONES.....	43
5. BIBLIOGRAFÍA.....	44

ÍNDICE DE IMÁGENES

Figura 1.2.1. Obtención de células binucleadas después de bloquear la citocinesis con citocalasina-B (Cyt-B)	7
Figura 1.2.2. Posibles rutas de las células cultivadas con bloqueo de la citocinesis expuestas a agentes citotóxicos/genotóxicos.....	8
Figura 1.2.3. Pruebas centroméricas para determinar la formación de MN y aneuploidía.....	9
Figura 1.2.2.1. Microfotografías de células binucleadas de un ensayo de micronúcleos.....	11
Figura 1.2.3.1. Microfotografías de micronúcleos en células binucleadas	11
Figura 1.2.4.1. Microfotografías de células mono, bi y polinucleadas de un ensayo de micronúcleos.....	12
Figura 1.3.2.1. Estructura de Acetato de β -Amirina	17
Figura 1.3.3.1. Estructura de Dehidroleucodina (DhL).....	21

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 2.6.1.a. Esquema de tratamiento de los linfocitos con Acetato de β -amirina	27
Cuadro 2.6.1.b. Esquema de tratamiento de los linfocitos con Dehidroleucodina (DhL).....	27

ÍNDICE DE FIGURAS

2.8 Diagrama del ensayo.....	30
------------------------------	----

ÍNDICE DE GRÁFICAS

Gráfica 3.1. Porcentaje de viabilidad de los linfocitos tratados con Acetato de β -Amirina	32
Gráfica 3.2. Porcentaje de viabilidad de los linfocitos tratados con Dehidroleucodina.....	33
Gráfica 3.3. Efecto de la molécula Acetato de β -Amirina en la proliferación celular	34
Gráfica 3.4. Efecto de la molécula Dehidroleucodina (DhL) en la proliferación celular	34
Gráfica 3.5. Índice de división nuclear calculado para los linfocitos tratados con la Acetato de β -Amirina	35
Gráfica 3.6. Índice de división nuclear calculado para los linfocitos tratados con la Dehidroleucodina	37
Gráfica 3.7. Efecto genotóxico en los linfocitos humanos expuestos a Acetato de β -Amirina	38
Gráfica 3.8. Efecto genotóxico de dehidroleucodina sobre la frecuencia de CBN con MN en los linfocitos humanos	40

RESUMEN

Las plantas medicinales juegan un rol importante en el tratamiento de enfermedades como el cáncer y constituyen una fuente invaluable de metabolitos secundarios para la obtención de nuevos agentes antineoplásicos. No obstante, considerando los posibles peligros que entrañan sus extractos o sus derivados sobre el material genético, es imperativo su evaluación mediante ensayos de genotoxicidad que permitan determinar los efectos tóxicos inducidos por estos agentes y que sustenten seguridad, efectividad y calidad requeridas para la administración en humanos.

En el presente trabajo se evaluó la actividad citostática y genotóxica de las moléculas acetato de β -amirina y dehidroleucodina, aisladas de las plantas *Clusia latipes* y *Gynoxis verrucosa* respectivamente, empleando el modelo de micronúcleos con bloqueo de la citocinesis en linfocitos humanos. Al evaluar la actividad citostática de acetato de β -amirina se observó una disminución en la proliferación celular a las concentraciones probadas. Por otra parte, dehidroleucodina también presentó efectos citostáticos estadísticamente significativos ($p < 0.05$) con respecto al control negativo (DMSO). Los resultados de la actividad genotóxica mostraron una respuesta dosis-dependiente, pues al aumentar la concentración en ambas moléculas se incrementa el número de micronúcleos como resultado de daño al ADN por mecanismos aneugénicos o clastogénicos.

Palabras clave: micronúcleos, citostático, genotóxico, acetato de β -amirina, dehidroleucodina.

ABSTRACT

The medicinal plants are important in the treatment of illnesses such as the cancer and are a source of secondary metabolites for the obtaining of new anticancer agents. Nevertheless, considering the possible dangers that involve their extracts or their derived on the genetic material, it is important to know its genotoxic activity by genotoxicity test that allow determining its toxic effects and that they sustain could be administration in human.

We have determinate the cytostatic and genotoxic activity against human lymphocytes using the cytokinesis-blocked micronucleus assay with the molecules β -amyrin acetate and dehydroleucodine, isolated of the plants *Clusia latipes* and *Gynoxis verrucosa* respectively. β -amyrin acetate exhibited a high degree of growth inhibition against lymphocytes in the proved concentrations. On the other hand, dehydroleucodine also presented statistically cytostatic effects significant ($p < 0.05$) compared with the negative control (DMSO). The results of the genotoxic activity show an answer dose-dependent, because when increasing the concentration in both molecules the micronucleus number it is increased as a result of damage to the DNA by aneugenic or clastogenic effects.

Key words: micronucleus, cytostatic, genotoxic, β -amyrin acetate, dehydroleucodine.

OBJETIVOS

GENERAL:

Evaluar la actividad genotóxica de las moléculas Acetato de β -Amirina y Dehidroleucodina, mediante el ensayo CBMN en linfocitos humanos.

ESPECÍFICOS:

Establecer las dosis subtóxicas a probar en el ensayo de micronúcleos con bloqueo de la citocinesis mediante la técnica de doble tinción FDA-BrEt.

Establecer el efecto citostático de las moléculas Acetato de β -Amirina y Dehidroleucodina, mediante Índice de División Nuclear en linfocitos humanos.

Determinar el efecto genotóxico de las moléculas Acetato de β -Amirina y Dehidroleucodina, mediante la evaluación de Micronúcleos en linfocitos humanos.

1. INTRODUCCIÓN

1.1.GENOTOXICIDAD

1.1.1.Definición

La Toxicología Genética estudia los efectos tóxicos que ejercen los agentes químicos, físicos y biológicos sobre el ADN y los procesos genéticos de las células y organismos vivos (Klaassen y Watkins, 2005), siendo su principal objetivo detectar y estudiar las propiedades y mecanismos de acción de aquellos agentes que son altamente específicos para los ácidos nucleicos, especialmente los que actúan sobre el ácido desoxirribonucleico (ADN). Esto adquiere gran importancia por la correlación que existe entre el daño al ADN y las enfermedades hereditarias, así como también con las afectaciones somáticas de diverso origen entre ellas el envejecimiento y el cáncer (Remigio *et al.*, 2008).

Un compuesto es considerado *genotóxico* si tiene afinidad para interaccionar con el ADN e inducir daño genético a concentraciones que no son tóxicas o que están asociadas con un bajo grado de toxicidad (Martínez 2005).

1.1.2.Naturaleza de los mutágenos

1.1.2.1. Mutágenos químicos

Los mutágenos químicos pueden producir alteraciones en las bases directamente en forma de aductos o indirectamente intercalando un compuesto entre los pares de bases. Son muchas las sustancias electrófilas que reaccionan con el ADN formando productos de adición covalente (aductos). Dentro de los mutágenos químicos directos que no necesitan ser metabolizados para formar aductos con el ADN tenemos: los agentes alquilantes directos, multifuncionales, los epóxidos, los aldehídos y otros mutágenos de acción directa. Entre los mutágenos químicos que dañan el ADN indirectamente se encuentran: los mutágenos oxidativos, la hidrazina, la isoniazida, entre otros (Klaassen y Watkins, 2005; Paz-y-Miño *et al.*, 2003).

1.1.2.2. Mutágenos físicos

Radiaciones ionizantes. Son capaces de arrancar electrones de la materia que está atravesando, debido a su elevada energía. La acción química de las radiaciones ionizantes puede ser directa o indirecta, según las ionizaciones que se produzcan en las mismas moléculas del material que se estudia o que sean los radicales radioinducidos los que causan transformaciones posteriores. Las radiaciones ionizantes producen roturas mono o bicatenarias del ADN y una amplia gama de daños en las bases. Estas anomalías cromosómicas aparecen en las células radiadas durante la fase G1, antes de que se duplique el material genético. Si las células son radiadas en la fase G2, puede haber aberraciones de las cromátidas. La proporción relativa de las lesiones del ADN depende del tipo de radiación (Kasper *et al.*, 2006; Klaassen y Watkins, 2005; Paz-y-Miño *et al.*, 2003).

Luz ultravioleta. Es una radiación no ionizante capaz de producir efectos mutagénicos. La máxima efectividad mutagénica corresponde a las longitudes de onda de absorción máxima por parte de los ácidos nucleicos y las proteínas. Los ácidos nucleicos tienen un máximo de absorción de 256nm, siendo las pirimidinas y las purinas las estructuras responsables de esta absorción. En el caso de las proteínas, los aminoácidos aromáticos son los que presentan la máxima absorción, la tirosina a 275nm y el triptófano a 280nm. La luz ultravioleta provoca dos lesiones predominantes: los dímeros de pirimidina ciclobutano y los 6,4-fotoproductos (Klaassen y Watkins, 2005; Paz-y-Miño *et al.*, 2003).

1.1.2.3. Mutágenos biológicos

Los virus y, en menor grado, las bacterias son los agentes biológicos relacionados con la aparición de cánceres humanos. En la especie humana, los virus sólo son responsables de un 5 y 10% de la aparición de los cánceres. Entre los virus podemos señalar los papilomas (HPV-16 y HPV-18) que contienen oncogenes (E6, E7) en su genoma, los cuales inactivan las proteínas codificadas por los genes supresores de tumores (*Rb*, p53) de las células que infectan. En otros casos, es probable que

el mecanismo de acción sea epigenético o, incluso, disminuya la acción del sistema inmune. Entre estos virus podemos mencionar el de la hepatitis B, el de Epstein-Barr, los virus herpes simplex, el herpes virus HHV8, y retrovirus como los de la leucemia de células T humanas (HTLV-I y II) y el de la inmunodeficiencia (VIH) (Paz-y-Miño *et al.*, 2003).

1.1.3. Pruebas para detectar las alteraciones genéticas

Las pruebas de toxicología genética tienen dos propósitos distintos:

- Reconocer los mutágenos para identificar el peligro.
- Caracterizar la relación entre la dosis y la respuesta y los mecanismos mutágenos (Klaassen y Watkins, 2005).

Las pruebas de genotoxicidad son ensayos que evidencian las alteraciones causadas al material genético, de manera directa o indirecta, por agentes ambientales, tanto en células somáticas como germinales. La adecuada determinación de la actividad genotóxica exige la disponibilidad de métodos de detección específicos. El primer paso para realizar los estudios de evaluación genotóxica es la ejecución de ensayos *in vitro* que permitan evaluar el potencial mutagénico de los compuestos químicos en breve tiempo. Estos ensayos de genotoxicidad a corto plazo resultan de gran utilidad porque permiten detectar mutaciones génicas, aberraciones cromosómicas, daño primario a la estructura del ADN, transformaciones celulares u otras afectaciones inducidas por compuestos químicos o físicos que abundan en el ambiente (Arencibia y Rosario, 2009).

La evaluación genotóxica para compuestos de nueva síntesis y fitofármacos es de carácter obligatorio a nivel internacional. La diversidad de efectos deletéreos a los que está expuesto el material hereditario es imposible de detectar a través de un único sistema de ensayo (Arencibia y Rosario, 2009). Por lo que esta debe ser realizada, en primera instancia, mediante ensayos *in vitro*, validados internacionalmente, que midan el daño en los niveles de: Mutación génica y/o Mutación cromosómica. En

dependencia de los resultados *in vitro* debe continuarse, en segunda instancia, con ensayos *in vivo* que respondan a los dos mismos niveles de daño genético que se evaluaron *in vitro* (Piloto *et al.*, 2009).

El amplio espectro de mutaciones que pueden originarse no sería abarcado en un ensayo aislado y ofrecería un resultado poco preciso, por lo que se justifica el empleo del mayor número de ensayos *in vitro* e *in vivo* que permitan una correcta extrapolación del efecto genotóxico de la sustancia de interés para poder predecir con certeza un posible efecto carcinogénico del compuesto en estudio y realizar una correcta extrapolación de los hallazgos detectados, al hombre (Arencibia y Rosario, 2009; Gómez y Zúñiga, 2007).

Los principales ensayos sobre toxicología genética son:

- I. *Pruebas de daño y reparación del ADN*: detección directa y pruebas bacterianas para el daño del ADN, pruebas para el daño reparable del ADN en células de mamíferos.
- II. *Pruebas de mutación de genes en procariontes*: pruebas bacterianas de mutación inversa y de mutación anterógrada.
- III. *Pruebas en eucariotas no mamíferos*: pruebas en hongos para mutaciones de genes, para aneuploidía y de recombinación inducida en hongos, pruebas en plantas y en *Drosophila*.
- IV. *Pruebas de mutaciones de genes en mamíferos*: pruebas *in vitro* para las mutaciones anterógradas, pruebas *in vivo* para las mutaciones de genes en células somáticas y pruebas transgénicas.
- V. *Pruebas citogenéticas en mamíferos*: aberraciones cromosómicas, micronúcleos, intercambio de cromátidas hermanas y aneuploidía en células mitóticas.
- VI. *Mutagénesis en células germinales*: medición del daño del ADN, mutación de genes, aberraciones cromosómicas, mutaciones letales dominantes y aneuploidía (Klaassen y Watkins, 2005).

1.2. ENSAYO DE MICRONÚCLEOS CON BLOQUEO DE LA CITOCINESIS (CBMN)

1.2.1. Introducción

El ensayo de micronúcleos ha emergido como uno de los métodos preferidos para establecer el daño cromosómico, ya que es posible medir la pérdida o rompimiento de un cromosoma. Los micronúcleos (MN) son pequeñas formaciones nucleares que se presentan además de los dos núcleos típicos que se forman en la telofase (Roldán y Pérez, 2002), se originan de fragmentos cromosómicos acéntricos o cromosomas enteros que han quedado rezagados en la anafase durante la división nuclear (Fenech 2006, 2007; Zalacain *et al.*, 2005). Este proceso puede producirse de manera errónea debido a errores durante la replicación y posterior división del ADN, a roturas cromosómicas y al efecto de la radiación y de sustancias genotóxicas, produciéndose pérdida cromosómica y haciendo que el reparto del material genético no sea equitativo (Zalacain *et al.*, 2005).

Los MN que derivan de fragmentos acéntricos se forman por ruptura directa del ADN, replicación del ADN dañado e inhibición de la síntesis de ADN, en tanto que, los que se originan de cromosomas enteros se forman por alteraciones del huso mitótico, cinetocoro, daño en las subestructuras del cromosoma u otras partes del huso mitótico y alteraciones en la fisiología celular (Albertini *et al.*, 2000).

Los agentes clastogénicos inducen la formación de MN por roturas de la doble hélice de ADN, por esta razón los fragmentos acéntricos que se forman son incapaces de adherirse a las fibras del huso e integrarse al núcleo hijo durante la mitosis. Lo mismo ocurre con cromosomas enteros que tienen dañados los cinetocoros; en donde las cromátidas no pueden ser arrastradas hacia los polos durante la mitosis quedando fuera del nuevo núcleo (Serrano y Montero, 2001). La clastogenicidad ha sido relacionada con procesos de envejecimiento prematuro, alteraciones vasculares e inducción de diversos tipos de cáncer (Martínez 2005).

Los agentes aneugénicos impiden la formación del huso acromático durante la mitosis. Estos agentes no sólo generan MN por dejar fuera a las cromátidas del nuevo núcleo, sino también, conducen a la formación de células multinucleadas, en las que cada núcleo puede contener un número diferente de cromosomas (Serrano y Montero, 2001). Un aumento significativo de la frecuencia de MN que contengan cromosomas enteros puede tener consecuencias negativas para la salud humana, dado que las aneuploidías, ya sean somáticas o germinales, se han correlacionado con abortos espontáneos, retraso mental y carcinogénesis entre otras alteraciones. El ensayo de MN es uno de los pocos ensayos disponibles para analizar alteraciones citogenéticas tempranas en tejidos epiteliales, antes de que ocurran los cambios malignos (Martínez 2005).

Heddle (1973) y Schmid (1975) fueron los primeros investigadores que de manera independiente propusieron el ensayo de micronúcleos (MN), como una prueba alternativa y simple para determinar el daño cromosómico *in vivo* en poblaciones celulares en división (Arencibia y Rosario, 2009).

El uso de la citocalasina-B (cyt-B) fue propuesto por Fenech y Morley (1985) como un método sencillo y efectivo (Martínez 2005; Montero *et al.*, 1997), para frenar el proceso de división celular cuando la célula sólo hubiese sufrido una división mitótica, para ello desarrollaron la técnica del bloqueo de la citocinesis cuyo fundamento es la utilización de un agente químico denominado citocalasina-B (Fig. 1.2.1) (Zalacain *et al.*, 2005), un inhibidor de la polimerización de la actina, proteína requerida en la formación del anillo de microfilamentos necesario para la partición celular en telofase mitótica (Arencibia y Rosario, 2009; Fenech 2007; Martínez 2005; Zalacain *et al.*, 2005).

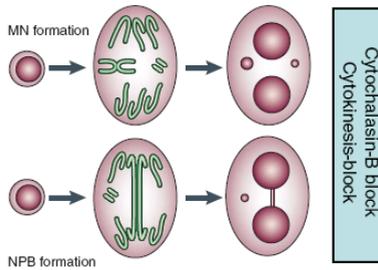


Fig 1.2.1. Obtención de células binucleadas después de bloquear la citocinesis con citocalasina-B (Cyt-B) (Fenech 2007)

El ensayo de micronúcleos con bloqueo de la citocinesis (CBMN) en linfocitos humanos de sangre periférica es uno de los bioensayos más utilizados en la evaluación de daño cromosómico inducido por agentes físicos o químicos, capaces de producir efectos clastogénicos y aneugénicos (Di Giorgio *et al.*, 1996; Di Giorgio *et al.*, 2003; Ergene *et al.*, 2007), por lo que es una herramienta útil para la evaluación de compuestos genotóxicos y monitoreo de exposiciones humanas a carcinógenos ambientales (Humpage *et al.*, 2000).

El CBMN es un método eficaz para medir roturas cromosómicas, rearreglo cromosómico, pérdida cromosómica, no disyunción, necrosis, apoptosis y efecto citostático (medido por el grado de células mono, bi y polinucleadas). Actualmente, este método también es utilizado para medir puentes nucleoplásmicos (NPBs), que se originan de cromosomas dicéntricos los cuales son arrastrados hacia los polos opuestos de la célula durante la anafase, y amplificación de genes (NBUDs), formados durante la fase S del ciclo celular y morfología similar a un MN, con la excepción de que están unidos al núcleo por un amplio o delgado tallo de material nucleoplásmico (Fig. 1.2.2) (Fenech 2006, 2007).

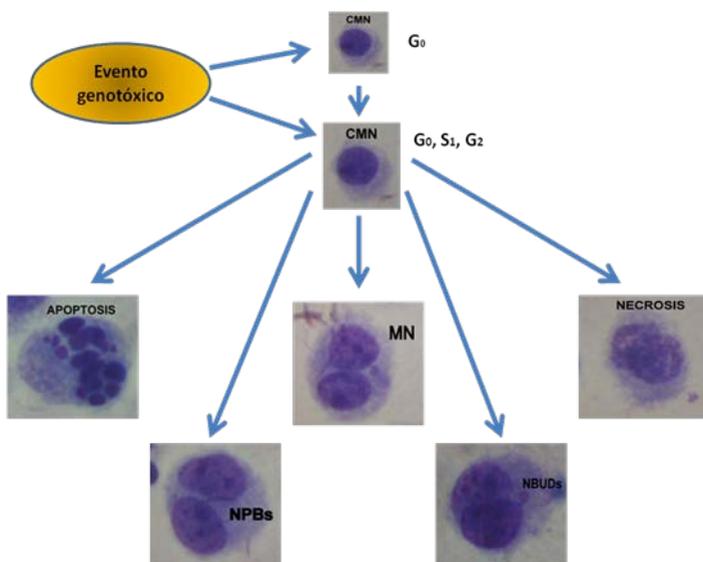


Figura. 1.2.2. Posibles rutas de las células cultivadas con bloqueo de la citocinesis expuestas a agentes citotóxicos/genotóxicos (Fuente: Autor).

Los micronúcleos pueden corresponder tanto a cromosomas enteros como a fragmentos acéntricos y pueden ser identificados usando anticuerpos anti-cinetocoro o empleando la técnica de hibridación *in situ* con fluorescencia (FISH), en la cual se utiliza una sonda pancentromérica, para determinar su origen. Si el MN presenta una marca centromérica significa que contiene una cromosoma completo; en cambio, si el MN no presenta proteínas del cinetocoro o marca centromérica, significa que contiene un fragmento acéntrico, debido a una rotura cromosómica y, por lo tanto, puede deberse al efecto de un agente clastogénico (Fig. 1.2.3) (Albertini *et al.*, 2000; Fenech 2007; Martínez 2005). La evaluación del mecanismo de origen en MN individuales mediante la identificación del centrómero y cinetocoro contribuyen a la alta sensibilidad y especificidad de este método (Mauteca *et al.*, 2006).

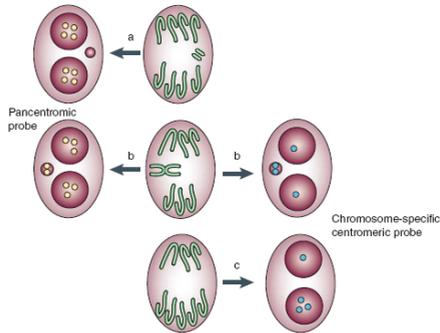


Figura. 1.2.3. Pruebas centroméricas para determinar la formación de MN y aneuploidía (Fenech 2007)

El ensayo CBMN fue validado a nivel mundial con el Human Micronucleus (HUMN) project, realizado en más de 30 laboratorios alrededor del mundo (Fenech *et al.*, 2003; Fenech 2007), y considerado como un biomarcador efectivo de daño en el ADN (Zalacain *et al.*, 2005). El ensayo también provee información valiosa para complementar los resultados de otros ensayos *in vitro* de genotoxicidad (Noel *et al.*, 2006).

Recientemente ha sido propuesto que el ensayo de MN sea usado en lugar del test de recuento de cromosomas para el ensayo de genotoxicidad de nuevos agentes químicos. Esta propuesta está basada en las ventajas que tiene el ensayo de MN sobre el recuento de cromosomas. Dentro de ellas se distinguen las siguientes:

- Los micronúcleos en las células en interfase pueden ser contados mucho más objetivamente que las aberraciones cromosómicas en células en interfase.
- No hay un requerimiento riguroso para el entrenamiento detallado del personal competente para este ensayo; esto permite mayor rapidez en el conteo de las preparaciones.
- Mayor poder estadístico al poder contar miles de células por tratamiento.

- Como los micronúcleos pueden contener cromosomas completos, se pueden detectar agentes inductores de aneuploidía, los cuales son muy difíciles de estudiar en el ensayo de aberraciones cromosómicas convencionales (Arencibia y Rosario, 2009)

Es conveniente que el ensayo de micronúcleos se aplique a células que han experimentado sólo una división celular después de la exposición al agente ya que los MN se pueden perder en divisiones sucesivas, lo que conduciría a subestimar el daño genético inducido. Para facilitar la evaluación, se utiliza la citocalasina-B para obtener células binucleadas (con una división) y detectar también las células mononucleadas y polinucleadas, las cuales no se incluyen en la evaluación debido a que, si no se han dividido y son células dañadas no han tenido la oportunidad de expresar el daño, y si se han dividido más de una vez, pueden haber perdido material genético sin que lo podamos detectar. En ambos casos se puede subestimar la evaluación del daño (Martínez 2005), por lo cual, existen criterios de selección para reconocer tanto en las células en las que se va a efectuar el recuento de MN, así como los criterios para identificar los MN que presenten las características necesarias para ser reconocidos como tales y permitan un recuento fiable y objetivo (Zalacain *et al.*, 2005).

1.2.2. Criterios para identificar células binucleadas

Las células con la citocinesis bloqueada que pueden ser contadas para la frecuencia de MN presentan las siguientes características:

- Las células deben ser binucleadas.
- Los núcleos deben tener la membrana nuclear intacta y estar situados dentro del límite citoplásmico.
- Los núcleos deben ser aproximadamente iguales en tamaño y presentar un patrón de tinción similar.
- Los núcleos pueden estar unidos por un fino puente nucleoplásmico.
- Los dos núcleos en una célula BN pueden tocarse pero lo ideal sería que no se cubran el uno al otro. Una célula

con dos núcleos sobrepuestos puede ser contada sólo si las membranas de cada uno de estos son distinguibles.

- El límite citoplásmico o la membrana de una célula BN debe estar intacta y claramente distinguible del límite citoplásmico de células adyacentes (Fig. 1.2.2.1) (Fenech *et al.*, 2003; Fenech 2007; Kirsch-Volders *et al.*, 2000).

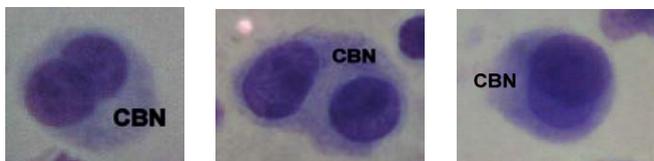


Figura. 1.2.2.1. Microfotografías de células binucleadas de un ensayo de micronúcleos (Fuente: Autor).

1.2.3. Criterios para identificar micronúcleos

Los MN son morfológicamente idénticos al núcleo principal pero de menor tamaño. Tienen las siguientes características:

- El diámetro de MN en linfocitos humanos varía entre $1/16$ y $1/3$ del diámetro del núcleo principal.
- Los MN no son refringentes.
- Los MN no están unidos al núcleo principal.
- Los MN pueden tocar pero no cubrir al núcleo principal y su membrana se debe ver claramente.
- Los MN tienen similar tinción que el núcleo principal, pero en ocasiones puede ser más intensa (Fig. 1.2.3.1) (Fenech *et al.*, 2003; Fenech 2007; Kirsch-Volders *et al.*, 2000).

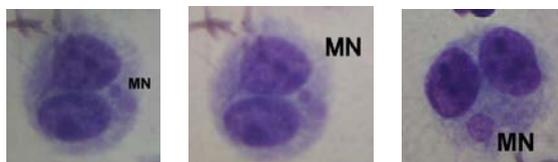


Figura. 1.2.3.1. Microfotografías de micronúcleos en células binucleadas (Fuente: Autor)

1.2.4. Obtención del Índice de División Nuclear

El Índice de División Nuclear (IDN) provee una medida del grado de proliferación de la fracción celular viable (Fig. 1.2.4.1). El IDN y la proporción de células binucleadas son indicadores de la respuesta mitógena de los linfocitos y del efecto citostático de los agentes utilizados en el ensayo (Fenech 2000, 2007).

Son contadas 200 células viables para determinar la frecuencia de células con uno, dos, tres o más núcleos y obtener el IDN usando la siguiente fórmula:

$$\text{IDN} = [\text{CMN} + 2(\text{CBN}) + 3(\text{CPN})] / \text{N}$$

Donde:

CMN= Células mononucleadas

CBN= Células binucleadas

CPN= Células polinucleadas

N= Número total de células viables contadas (200).

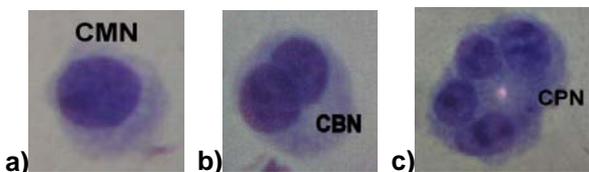


Figura. 1.2.4.1. Microfotografías de células de un ensayo de micronúcleos. a) Mononucleadas; b) Binucleadas; c) Polinucleadas (Fuente: Autor)

Para estudios con linfocitos humanos, utilizando el ensayo de CBMN, es importante reconocer las variables que pueden afectar la frecuencia de MN como son la edad, género, exposiciones ocupacionales (Kirsch-Volders *et al.*, 2000; Zalacain *et al.*, 2005), hábito de fumar, consumo de alcohol, dieta (Di Giorgio *et al.*, 1996) y susceptibilidad individual (Mauteca *et al.*, 2006)

De estudios previos se sabe que la frecuencia de MN en mujeres es aproximadamente 1,4 veces mayor a la de los hombres (Martínez 2005), posiblemente debido a la aneuploidía de

cromosomas X comúnmente observada en mujeres con el aumento de la edad. (Di Giorgio *et al.*, 1996; Fenech *et al.*, 1994; Mauteca *et al.*, 2006; Wojda *et al.*, 2007). Además, en el caso de las mujeres, procesos fisiológicos como la menopausia y osteoporosis se relacionan con un mayor índice de MN (Zalacain *et al.*, 2005).

Otro factor que ha sido ampliamente estudiado es la edad, ya que conforme aumenta la edad se observa un mayor número de MN (Martínez 2005; Wojda *et al.*, 2007), lo que está directamente relacionado con la disminución de la capacidad reparadora del ADN y la inestabilidad genómica (Wojda *et al.*, 2007).

Diversos estudios han demostrado que la exposición reiterada a agentes citostáticos, determinados pesticidas y plaguicidas, y otros agentes tóxicos puede causar efectos adversos tales como mutaciones, inmunotoxicidad y cáncer debido a que pueden inducir daños genéticos y alterar los mecanismos de división en células que se multiplican rápidamente, dando como resultado un incremento significativo en el número de MN. También se ha observado un ligero aumento de MN en personas fumadoras frente a no fumadoras y una clara asociación entre años de consumo de tabaco e incremento de la frecuencia de MN (Mauteca *et al.*, 2006; Zalacain *et al.*, 2005)

Un parámetro adicional que puede influir en la frecuencia de MN en humanos es el polimorfismo en genes responsables de la activación metabólica o detoxificación de agentes clastógenos (Mauteca *et al.*, 2006), por lo tanto, estos le confieren una mayor o menor susceptibilidad al organismo, frente a diversas exposiciones con potencial genotóxico (Martínez 2005).

Tomando en cuenta lo anterior y la gran versatilidad que ofrece el ensayo CBMN para evaluar el daño al ADN por diversos agentes, constituye un buen método para el cernimiento primario de potenciales fármacos antineoplásicos provenientes de productos naturales o de sus derivados.

PRINCIPIOS ACTIVOS DE ORIGEN VEGETAL

1.2.5.Introducción

El uso de plantas con posibles propiedades medicinales data de épocas muy remotas. Actualmente se estima que unas 20 000 especies de plantas son utilizadas como medicamentos a nivel mundial (Rodríguez *et al.*, 2006), sobre todo en aquellos países donde la asequibilidad a servicios de salud y medicinas básicas es limitada, la medicina natural tiene un rol significativo para atender sus necesidades primarias de asistencia médica (Ansah *et al.*, 2004).

La obtención de nuevos fármacos a partir de la biodiversidad es uno de los ejercicios científicos más importantes, tomando en consideración la potencialidad de encontrar nuevas estructuras que puedan constituirse en cabezas de serie, y debido a la creciente tendencia de la población a consumir productos terapéuticos (Brugés y Reguero, 2008). Se han identificado productos vegetales (incluidos extractos de plantas) capaces de modificar la actividad de mutágenos y carcinógenos como: pigmentos, vitaminas, carotenos, lactonas fenólicas, flavonoides y taninos. Un número limitado de plantas, particularmente de relevancia médica, han sido estudiadas por sus posibles propiedades citotóxica y genotóxicas. Estudios adicionales han sido necesarios para evaluar las posibles actividades antimutagénicas, anticlastogénicas y/o anticarcinogénicas de las plantas y sus derivados (Sánchez-Lamar *et al.*, 1999).

De tal manera que no solo las plantas continúan siendo fuente importante en el descubrimiento de nuevos fármacos, sino que también es posible aislar moléculas susceptibles a ser transformadas, con el fin de optimizar una determinada actividad biológica (Malagón 2007). La búsqueda de metabolitos secundarios de origen vegetal involucra una combinación de técnicas botánicas, fitoquímicas, biológicas y moleculares; que juegan un papel importante en el tratamiento del cáncer (Parra *et al.*, 2005), malaria, Alzheimer, HIV y otras enfermedades (Balunas *et al.*, 2006).

Entre los agentes anticancerígenos provenientes de plantas están los alcaloides de la Vinca, epidodofitoxinas, taxanos y derivados de la campotecina, los cuales contribuyen en la quimioterapia del cáncer. (Balunas *et al.*, 2006; Kinghorn *et al.*, 2003).

Sin duda, las plantas han sido utilizadas a través de la historia para tratar innumerables enfermedades, una práctica que ha llevado a la síntesis de moléculas provenientes de plantas con actividades medicinales (Hernández *et al.*, 2002), las cuales constituyen una fuente potencial de triterpenos y lactonas sesquiterpénicas con uso farmacéutico promisorio.

1.2.6.Triterpenos

Los triterpenos constituyen un grupo importante y estructuralmente diverso de metabolitos secundarios, son compuestos de 30 carbonos procedentes del escualeno (Bruneton 2001; Parra *et al.*, 2005).

Para químicos, bioquímicos y biólogos son un interesante grupo de moléculas naturales, no sólo por su relativa ubicuidad y fácil extracción y aislamiento, sino también por sus actividades biológicas y aplicaciones (Rosellón 2005).

El estudio sistemático de plantas con antecedentes etnomédicos, ha conducido al aislamiento de diversos triterpenos biodinámicos. Así, se conocen triterpenos antioxidantes, antiinflamatorios, hepatoprotectores, cardioprotectores, antagonistas de los receptores de estrógeno, antiproliferativos, citotóxicos en líneas celulares de cáncer humano, antiangiogénicos y proapoptóticos (Parra *et al.*, 2005).

Se han descrito más de 100 triterpenos con actividad citotóxica. Algunos de éstos son los del tipo ursano, oleanano, cicloartano, lupano, así como las quinonas metilúricas. Los compuestos referidos más frecuentemente en la literatura pertenecen a los dos primeros tipos (Parra *et al.*, 2005).

Algunos triterpenos citotóxicos del tipo ursano como el ácido ursólico, corosólico, pomólico, euscáfico y acetil- β -boswélico

constituyen ejemplos clásicos de uranos bioactivos. La actividad biológica del ácido ursólico se atribuye a su acción sobre diferentes blancos moleculares. Éste es un inhibidor de algunas de las enzimas involucradas en la duplicación celular, como son la ligasa I y las polimerasas del ADN. En células de cáncer, el ácido ursólico incrementa la concentración de calcio intracelular e induce arresto celular en Go/G1 mediado por p21^{waf1}, liberación de citocromo c y finalmente apoptosis mediada por activación de la caspasa 3 (Parra *et al.*, 2005).

Los triterpenos de tipo oleanano también poseen actividad anticancerosa. Se ha demostrado que el ácido oleanólico posee actividad citotóxica sobre diferentes líneas celulares de cáncer. Además, este compuesto induce la diferenciación en líneas celulares de leucemia murina y humana. El ácido oleanólico inhibe las reacciones de adenilación y ligación catalizadas por la ligasa I del ADN humano. También, se conoce que este compuesto inhibe la actividad de la polimerasa β del ADN de rata, estimula la liberación de óxido nítrico (ON) y TNF- α , a través de la regulación de la expresión de la enzima óxido nítrico sintetasa y el factor de necrosis tumoral, por el factor nuclear κ B (NF- κ B). Se conoce que algunos triterpenos del tipo oleanano son inhibidores catalíticos de las topoisomerasas humanas; sin embargo, hasta el momento no se ha descrito la actividad citotóxica o antiproliferativa de dichos compuestos. Entre esos compuestos se pueden mencionar al ácido acetil- α -boswélico, al olean-12-en-3 β ,15 α -diol y al olean-12-en-3 β ,15 α ,24-triol. Así mismo, se sabe que los 3-p-cumaratos (cis y trans) del ácido oleanólico son capaces de inhibir la polimerasa del ADN (Parra *et al.*, 2005)

El interés terapéutico y el empleo industrial de triterpenos los convierten en un grupo de metabolitos secundarios de gran importancia:

- Interés de los heterósidos cardiotónicos, a los que ningún producto sintético ha podido todavía sustituir completamente.
- Interés de las sapogeninas espirostánicas, del sitosterol o del estigmasterol que son materias primas muy útiles en

procesos biotecnológicos. Siguen siendo indispensable para cubrir las necesidades de la industria farmacéutica en medicamentos esteroidicos (anticonceptivos, anabolizantes, antiinflamatorios).

- Interés terapéutico de numerosas drogas con saponósidos utilizadas para la extracción de moléculas activas (escina, glicirricina), para la obtención de formas galénicas simples o preparados de fitoterapia.
- Importancia económica del regaliz, edulcorante poco calorígeno, muy utilizado en las industrias agroalimentarias.
- Importancia de los saponósidos en la medida en que su presencia puede disminuir de forma importante el valor nutritivo de forrajes (alfalfa) o conferir a las plantas de nuestro entorno cotidiano una toxicidad digna de tener en cuenta.
- Potencialidades terapéuticas en los campos más diversos: citostáticos, antivirales, insecticidas, antiinflamatorios, molusquicidas, analgésicos (Bruneton 2001).

Los triterpenos pueden ser alifáticos, tetracíclicos o pentacíclicos. Los triterpenos tetracíclicos están presentes en cucurbitáceas y poseen gran toxicidad, de ahí sus propiedades necrosantes. Dentro de los triterpenos pentacíclicos se encuentra el ácido glicirrético (regaliz), que tiene propiedad antiinflamatoria, y los derivados de la α -amirina y β -amirina (López 2007).

1.2.6.1. Acetato de β -Amirina

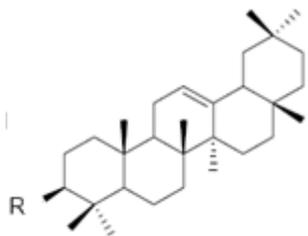


Figura. 1.3.2.1. Estructura del triterpeno, Acetato de β -Amirina;
R = CH₃-COO- (Parra *et al.*, 2005)

La familia Guttiferae (Clusiaceae) se encuentra ampliamente distribuida en las regiones tropicales y subtropicales de América Central y Sudamérica (Moura *et al.*, 2008). Las plantas de esta familia se caracterizan por presentar látex en sus tejidos, característica que le da nombre a esta familia. Está formada por alrededor de 1200 especies agrupadas en 45 géneros, dentro de los cuales el género *Clusia* es uno de los principales con alrededor de 250 especies (Mangas *et al.*, 2008; Moura *et al.*, 2008) comprendiendo árboles, arbustos y epífitas, siendo la mayoría dioicas (Vlasáková *et al.*, 2008).

Estudios fitoquímicos de plantas de este género revelan la presencia, fundamentalmente, de benzofenonas preniladas, aunque también se hace referencia a otros metabolitos dentro de los cuales se encuentran los flavonoides, terpenos y esteroides. Las especies de este género muestran una gran versatilidad en cuanto a actividades biológicas, lo que hace de ellas una fuente interesante de compuestos activos que pueden ser usados con diversos fines (Mangas *et al.*, 2008).

En el género *Clusia* se han identificado triterpenoides como α y β amirina, friedelina, aplotaxeno, ácido oleanólico, α y β friedelinol y el (17 α , 20R)-dammara-12,24-dien-3 β -ol (Mangas *et al.*, 2008).

En las especies de este género se han encontrado actividades farmacológicas tales como: actividad antimicrobiana de amplio espectro frente a una gran diversidad de bacterias, actividad quimiopreventiva del cáncer, antioxidante, antiinflamatoria, antihepatotóxica, acción inhibitoria del Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH) (Gomes da Camara 2002; Huerta-Reyes *et al.*, 2004; Mangas *et al.*, 2008) y actividad citotóxica en células de neuroblastoma (Díaz-Carballo *et al.*, 2008).

Estudios realizados en base a la amirina y sus ésteres muestran otras actividades farmacológicas a las ya mencionadas como: actividad anticonceptiva de la amirina aislada de *Ipomoea pes-caprae* (Krogh *et al.*, 1999), antiartrítica (éster de palmitato de α -amirina) (Kweifio-Okai *et al.*, 1994; Kweifio-Okai *et al.*, 1995) y citostática (Gómez *et al.*, 1997; Gómez *et al.*, 2001).

Los triterpenos α -amirina y β -amirina, así como sus ésteres, han sido descritos en varios estudios como poseedores de actividad antiinflamatoria (Aragao 2004). Algunos estudios espectroscópicos señalan que la presencia de la Amirina como núcleo base o algunos de sus derivados y otros esteroides, les confieren las propiedades de agentes antiinflamatorios (De la Rosa *et al.*, 1990).

En la región Sur del Ecuador, la familia *Clusiaceae* está distribuida a una altitud de 1800 a 2800 m (Uday y Bussmann, 2004). *Clusia latipes* (especie de la que se obtuvo la β -amirina, y posteriormente, su derivado la Acetato de β -amirina, -Fig. 1.3.2.1-) es utilizada en la medicina tradicional para tratar verrugas, una patología relacionada con el cáncer de piel (Tene *et al.*, 2007), por lo cual es importante realizar estudios que nos permitan conocer las actividades biológicas de sus extractos y metabolitos secundarios para poder ser considerados como posibles agentes terapéuticos.

1.2.7.Lactonas sesquiterpénicas

Los sesquiterpenos representan una gran distribución en la naturaleza y constituyen la clase más abundante de terpenoides. Dentro de los sesquiterpenos se destacan las lactonas sesquiterpénicas, las cuales poseen un amplio espectro de actividades biológicas (Oliveira 2005).

Las lactonas sesquiterpénicas son compuestos de 15 átomos de carbono con un anillo lactónico (Dupuy *et al.*, 2008; Lechuga 1995), constituyen un grupo estructural y numéricamente importante de metabolitos con alrededor de 3 500 estructuras conocidas (Blanco *et al.*, 1997; Polo *et al.*, 2007).

Los cuatro grupos principales son: germacranólidos, eudesmanólidos, guayanólidos y pseudoguayanólidos. Se admite que los principales esqueletos derivan, vía los germacranólidos (Bruneton 2001; Picman 1978).

El interés de las lactonas sesquiterpénicas se basa en su reactividad: el encadenamiento α -metilén- γ -lactona y los

frecuentes epóxidos son lugares reactivos para los nucleófilos biológicos, principalmente grupos tiol y amínicos de los lugares activos de diversas enzimas (glucógeno sintetasa, ADN polimerasa, timidilato sintetasa) que serán alquilados irreversiblemente, de ahí la amplia gama de actividades biológicas (Bruneton 2001).

Se han encontrado lactonas sesquiterpénicas en Hongos, Briofitas (Bruneton 2001), en familias como: Acanthaceae, Anacardiaceae, Apiaceae, Euphorbiaceae, Lauraceae, Magnoliaceae, Menispermaceae, Rutaceae, Winteraceae y Hepatidae y, muy mayoritariamente en las Asteraceae (Blanco *et al.*, 1997). En estas últimas, las lactonas se localizan frecuentemente en pelos secretores situados a nivel de las hojas, tallos y brácteas de la inflorescencia. A menudo se encuentran en los achenios, son raras en los órganos subterráneos (Bruneton 2001).

Dentro de las estrategias para combatir al cáncer, se ha explorado la acción de compuestos de origen vegetal como agentes terapéuticos donde sobresalen las lactonas sesquiterpénicas, las cuales han mostrado actividad citotóxica en un amplio espectro de líneas celulares (Cancino *et al.*, 2007).

Entre las actividades biológicas reportadas de las lactonas sesquiterpénicas se incluyen: actividad antitumoral (Lee *et al.*, 1977; Robles *et al.*, 1995), antimigraña (Beekman *et al.*, 1997), citoprotectora contra úlcera gástrica (Giordano *et al.*, 1992; Penissi *et al.*, 1998) entre las que se encuentran dehidroleucodina y ludartina (Giordano *et al.*, 1990). Numerosas lactonas son antibacterianas, sobre todo frente a bacterias Gram positivas: caso de las lactonas de helenio o la cnicina del cardo santo, *Cnicus benedictus* L. (Asteraceae). Algunas moléculas de la serie también son antifúngicas (Bruneton 2001). Asimismo, se ha demostrado que las lactonas sesquiterpénicas son inhibidoras de la contractibilidad del músculo liso (Hay *et al.*, 1994), de citocinas proinflamatorias (Hwang *et al.*, 1996), actividad de la aromatas (Blanco *et al.*, 1997) y de la activación nuclear del Factor-kappa B (NF-kappa B) (Hehner *et al.*, 1998; Lyss *et al.*, 1998).

Otros efectos reportados para las lactonas sesquiterpénicas son como analgésico, antipirético y antiinflamatorio (Morán, *et al.*, 1989), por otro lado, existen evidencias acerca de un efecto espermatotóxico en ratones (Qureshi *et al.*, 1990) y efecto antimalárico. Entre los compuestos antimaláricos aislados de plantas se encuentra artemisinina, descubierta y caracterizada a partir de *Artemisia annua* (*Asteraceae*) (Rodríguez *et al.*, 2006). De *Artemisia douglasiana* Besser (Matico) se ha aislado y purificado a la dehidroleucodina (DhL) (Giordano *et al.*, 1990), lactona sesquiterpénica que ocupa un lugar importante en la actualidad.

1.2.7.1. Dehidroleucodina (DhL)

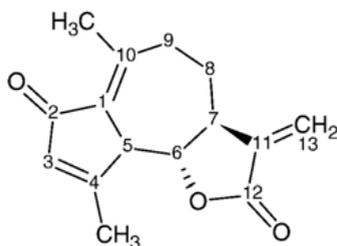


Figura. 1.3.3.1. Estructura de la lactona sesquiterpénica, dehidroleucodina (DhL) (Polo *et al.*, 2007)

Dentro de la familia *Asteraceae*, la cual es una de las familias más grandes de las angiospermas, se ha encontrado una gran diversidad química. La mayoría de sus miembros acumulan terpenos, mono-, sesqui-, di- y triterpenos. Entre los sesquiterpenos, las lactonas sesquiterpénicas son muy comunes en este grupo de plantas (Lechuga *et al.*, 1995). Las plantas que pertenecen a esta familia son tradicionalmente usadas como desinfectantes, para tratar el espanto, presión baja, problemas visuales, alergia, cólicos, heridas, dolor de estómago, dolores hepáticos, problemas de riñón, infecciones, fiebres a consecuencia de la malaria y fiebre amarilla (Tene *et al.*, 2007).

La especie a estudiar, *Gynoxys verrucosa*, Wedd, pertenece a la familia Asteraceae, conocida como guángalo o congona, es un arbusto usado en las provincias de Loja y Zamora-Chinchipe para el tratamiento y curación de heridas (Tene *et al.*, 2007). También se le atribuyen propiedades curativas para la presión sanguínea baja, depresión psicológica, problemas visuales, respiratorios y como sedante para cólicos (Astudillo 2006).

De los metabolitos secundarios de *Gynoxis verrucosa* se han aislado lactonas sesquiterpénicas como: dehidroleucodina, la cual presenta actividad antiinflamatoria, citotóxica (Malagón 2007) y antimicrobiana para *Staphylococcus sp.* (Ordóñez *et al.*, 2009). La dehidroleucodina (DhL), del grupo de los guallanólidos, está formada por un anillo alfametileno-butiro-gamma lactona conectado a un anillo de siete miembros que está fusionado a un anillo alfa betainsaturado ciclopentenona (Fig. 1.3.3.1) (Giordano *et al.*, 1990).

Se ha demostrado que el extracto de *A. douglasiana* y DhL tienen actividad antioxidante, por lo que previene la formación de lesiones gástricas inducidas por varios agentes necrosantes (María *et al.*, 2000), así como un efecto antiinflamatorio (Guardia *et al.*, 2003). También, la DhL ha demostrado tener actividad inhibitoria del complejo aromatasasa (P450) (Blanco *et al.*, 1997), antiproliferativa en células vasculares del músculo liso (VSMCs) (Cruzado *et al.*, 2005; Polo *et al.*, 2007) e inhibitoria del crecimiento de *Trypanosoma cruzi* (Bregio *et al.*, 2000).

Otras lactonas, como la squamocina, han sido probadas en líneas celulares de cáncer de ovario, cervical, de vejiga y de piel (Shyng-Shiou *et al.*, 2006). También se ha determinado la actividad antiproliferativa e inductora de apoptosis de la lactona sckhuriolida, aislada de las partes aéreas de la planta *Schukuria schkurioides*, en cultivos *in vitro* de la línea celular proveniente de cáncer cérvico-uterino Caski (Cancino *et al.*, 2007).

Los metabolitos secundarios que provienen de las plantas juegan un rol importante como coadyuvantes en la mejora de enfermedades como el cáncer. Se estima que la mayoría de fármacos antineoplásicos provienen de productos naturales o de

sus derivados (Kinghorn *et al.*, 2003); sin embargo para que sea admitido su empleo como fármaco, es necesaria la evaluación genotóxica de éstas (Sánchez-Lamar *et al.*, 1998).

Considerando el interés científico y comercial de buscar nuevos agentes anticancerígenos y todo lo mencionado hasta aquí, se ha propuesto evaluar la actividad genotóxica de las moléculas Acetato de β -Amirina y Dehidroleucodina (DhL) mediante el ensayo de micronúcleos con bloqueo de la citocinesis (CBMN) en linfocitos humanos.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Control positivo

Se utilizó mitomicina C como control positivo, se conoce que esta después de la reducción intracelular enzimática o química espontánea de la quinona y pérdida del grupo metoxi, se convierte en un fármaco alquilante bifuncional o trifuncional. En algunos sistemas experimentales, la reducción ocurre de preferencia en células hipóxicas. El fármaco inhibe la síntesis de ADN y el enlace cruzado de este último en las posiciones N⁶ de la adenina y O⁶ y N⁷ de la guanina. Además, la mitomicina causa roturas de cadenas únicas de DNA y cromosómicas (Brunton *et al.*, 2007). La mitomicina C es un agente antineoplásico de amplia actividad, puede utilizarse para la instilación intravesical en el tratamiento curativo de los carcinomas vesicales de células de transición y, asociado a radioterapia, para el tratamiento curativo del carcinoma anal (Kasper *et al.*, 2006). La dosis de mitomicina C para la realización de los experimentos fue de 1 μ M.

2.2. Control negativo

Se empleó Dimetilsulfóxido (DMSO) al 0.5%, partiendo de una concentración inicial del 100%.

2.3. Obtención de las moléculas Acetato de β -amirina y DhL

La molécula Acetato de β -amirina fue extraída y donada por la Dra. Natalia Bailón del Centro de Biología Celular y Molecular de la UTPL. La molécula Dehidroleucodina (DhL) fue extraída y donada por el Ph.D. Omar Malagón del Instituto de Química Aplicada de la UTPL.

2.4. Modelo biológico

Dependiendo de las características de cada estudio se pueden usar diferentes tipos celulares para aplicar el ensayo de MN. A partir del tejido sanguíneo se pueden realizar dos tipos de

cultivos diferentes. Por un lado, pueden utilizarse linfocitos aislados que representan un sistema de evaluación muy sensible para el análisis del potencial genotóxico, con la desventaja de que se necesitan mayores volúmenes de muestra. Por otra parte, los cultivos de sangre completa tienen la ventaja de que, al conservar componentes del plasma, reflejan más fielmente la situación *in vivo*. Esto se debe a que los eritrocitos y demás componentes del plasma tienen un papel muy importante en la activación metabólica de los promutágenos y también en la degradación de potenciales agentes genotóxicos (Martínez 2005).

Para la realización del ensayo de micronúcleos se trabajó con sangre de tres donantes de edad comprendida entre 20 y 25 años, clínicamente sanos, no fumadores y que no se encontraban recibiendo tratamiento farmacológico alguno. El ensayo se realizó con un total de siete repeticiones y cada una de estas por duplicado.

Los linfocitos humanos de sangre periférica fueron cultivados en medio RPMI-1640 (SIGMA R-4130), suplementado con L-Glutamina (Sigma) 1%, Antibiótico Antimicótico (Sigma) 1%, Aminoácidos no esenciales 1% y Fitohemaglutinina 1mg/ml (PHA) (Gibco). El medio se esterilizó usando filtro de celulosa (0,22 μ m) y jeringuilla de 10 ml.

2.5. Viabilidad celular

Para determinar el porcentaje de células vivas en los experimentos con las moléculas Acetato de β -amirina y Dehidroleucodina (DhL) se procedió a realizar la técnica de doble tinción con una solución de Diacetato de Fluoresceína-Bromuro de Etidio (FDA-BrEt) (Jones y Senft, 1985). La viabilidad celular se realizó paralelamente a la cosecha de los cultivos.

- En tubos eppendorf de 1.5 ml se colocó 100 μ L del cultivo celular resuspendido del tubo de fondo redondo (ver cosecha).

- Se centrifugó a 3000 rpm durante 5 minutos, a continuación se eliminó el sobrenadante y se colocó los tubos en hielo.
- Se adicionó 20 μL de la solución de tinción de FDA-BrEt de trabajo (600 μL de PBS, 25 μL de BrEt y 3.75 μL de FDA, preparada 30 minutos antes) y se resuspendió el pellet.
- Se tomó 20 μL de la suspensión y se depositó en un portaobjetos limpio; posteriormente se colocó un cubreobjetos y se evaluó en el microscopio de fluorescencia Axioskop 2 plus con el objetivo de 40x. Para obtener el porcentaje de viabilidad se determinó la frecuencia de células vivas (verdes) y muertas (rojas) en 200 células.

2.6. Evaluación del efecto citostático de las moléculas Acetato de β -amirina y DhL en linfocitos humanos.

Para la determinación del posible efecto citostático de las moléculas Acetato de β -amirina y DhL se empleó la técnica de micronúcleos con bloqueo de la citocinesis (CBMN), se utilizó linfocitos humanos de sangre periférica siguiendo el proceso que a continuación se detalla:

2.6.1. Siembra

- Se extrajo sangre por venopunción en tubos heparinizados.
- En tubos cónicos de 15 ml, se adicionó 6.3 ml de medio RPMI-1640 suplementado, 0.2 ml de fitohemaglutinina (PHA) y 0.5 ml de sangre entera heparinizada.
- Los cultivos se incubaron a 37°C durante 48 horas, con una concentración atmosférica de 5% de CO_2 .
- Transcurrido el tiempo de incubación, se agregó 12.6 μL de Citocalasina-B (4.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) a los cultivos y se realizó el tratamiento con las moléculas Acetato de β -amirina y DhL de acuerdo al esquema del Cuadro 2.6.1.a y Cuadro 2.6.1.b.

- Luego, se procedió a incubar durante 24 horas más a 37°C con una concentración atmosférica de 5% de CO₂.

Cuadro 2.6.1.a. Esquema de tratamiento de los linfocitos con Acetato de β -amirina

TRATAMIENTO				
	Vehículo	Concentraciones de prueba	*MMC	Citocalasina B
Control positivo	-----	-----	1 μ M (35 μ L)	4.5ug/ml (12.6 μ L)
Concentr. 50 uM	DMSO	50 uM (175 μ L)	-----	4.5ug/ml (12. μ L)
Concentr. 35 uM	DMSO	35 uM (122.5 μ L)	-----	4.5ug/ml (12.6 μ L)
Concentr. 20 uM	DMSO	20 uM (70 μ L)	-----	4.5ug/ml (12.6 μ L)
Control negativo	0.5%(35 μ L)	-----	-----	4.5ug/ml (12.6 μ L)

*MMC= mitomicina

Cuadro 2.6.1.b. Esquema de tratamiento de los linfocitos con Dehidroleucodina (DhL)

TRATAMIENTO				
	Vehículo	Concentraciones de prueba	*MMC	Citocalasina B
Control positivo	-----	-----	1 μ M (35 μ L)	4.5ug/ml (12.6 μ L)
Concentr. 25 uM	DMSO	25 uM (175 μ L)	-----	4.5ug/ml (12.6 μ L)
Concentr. 15 uM	DMSO	15 uM (105 μ L)	-----	4.5ug/ml (12.6 μ L)
Concentr. 5 uM	DMSO	5 uM (35 μ L)	-----	4.5ug/ml (12.6 μ L)
Control negativo	0.5%(35 μ L)	-----	-----	4.5ug/ml (12.6 μ L)

*MMC= mitomicina

2.6.2.Cosecha

- Después del tiempo de incubación, se procedió a resuspender los cultivos suavemente con micropipeta de 1ml y se traspasó el contenido del tubo cónico (en el que se realizó la siembra) a un tubo de fondo redondo (no estéril).
- Se agregó 1 ml de fijador de Carnoy frío (Metanol-Ácido acético 3:1) lentamente por las paredes del tubo, luego se resuspendió las células volteando suavemente los tubos 3 ó 4 veces.
- Se centrifugó a 1200 rpm durante 10 minutos, a continuación se eliminó el sobrenadante, dejando 2ml aproximadamente en el tubo.
- Se agregó 1 ml de fijador de Carnoy frío y se resuspendió las células suavemente utilizando micropipeta de 1 ml, luego se le añadió 5 ml de fijador frío y se resuspendió las células nuevamente.
- Se centrifugó a 1200 rpm durante 10 minutos, se eliminó el sobrenadante, dejando 2ml aproximadamente en el tubo, se agregó 5 ml de fijador y se procedió a centrifugar. Repetir esto cinco a seis veces más.
- Cuando ya se observó un botón de color ligeramente café y apariencia esponjosa se eliminó el sobrenadante y se dejó el botón de células en 0.5 ml de fijador para hacer las placas.
- Con una pipeta Pasteur se colocó la muestra en una placa, la cual previamente fue puesta en alcohol y luego en agua desionizada estéril (fría). Las placas se dejaron secar al ambiente durante 24 horas antes de la tinción.

2.6.3.Tinción

- Se sumergieron las placas durante 20 segundos en colorante eosina (Hemacolor) y después otros 20 segundos en colorante azul de metileno (Hemacolor).
- Se retiró el exceso de colorante con agua y se dejaron secar al aire.

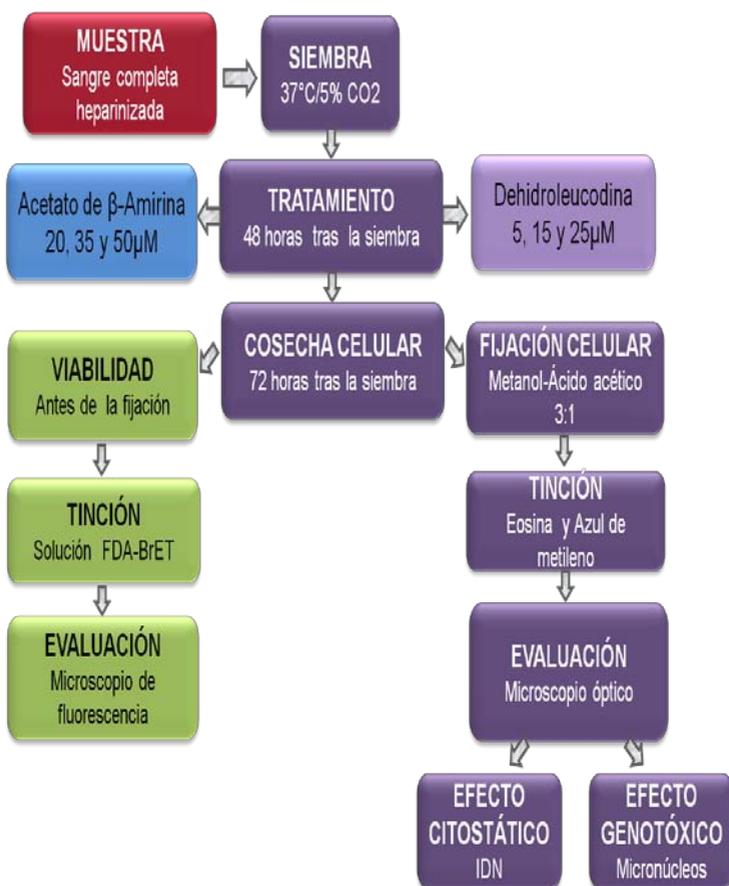
- Para establecer el efecto citostático mediante el Índice de División Nuclear (IDN) se analizaron 200 células/placa utilizando el microscopio óptico (objetivo de 100x), en donde se contaron células mono, bi y polinucleadas.

$$\text{IDN} = [\text{CMN} + 2(\text{CBN}) + 3(\text{CPN})] / \text{N}$$

2.7. Evaluación del efecto genotóxico de las moléculas Acetato de β -amirina y DhL en linfocitos humanos

- La evaluación del efecto genotóxico de las moléculas Acetato de β -amirina y DhL se efectuó al microscopio empleando las mismas preparaciones en donde se evaluó el efecto citostático. Se analizó la frecuencia de células binucleadas con micronúcleos en un total de 1000 células binucleadas/placa.

2.8. DIAGRAMA DEL ENSAYO



2.9. Análisis estadístico

Los datos obtenidos fueron analizados mediante ANOVA y la prueba de Dunnett para analizar la diferencia significativa entre el grupo control y los grupos tratados usando el software GraphPad Prisma® 5.0. Valores de $p < 0.05$ fueron considerados significativos.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se estima que en la actualidad el 80% de la población mundial depende de la medicina natural para el cuidado de sus problemas de salud, siendo las plantas y extractos la base fundamental para el descubrimiento y el desarrollo de agentes farmacéuticos. Además, la mayoría de los fármacos antineoplásicos provienen de productos naturales o de sus derivados, motivo por el cual están siendo constantemente examinados en un esfuerzo por aislar y caracterizar principios activos que supongan puntos de partida para estudios biológicos y médicos (Kingham *et al.*, 2003; Rosellón 2005).

La evaluación genotóxica de extractos de plantas medicinales y sus metabolitos es realizada mediante ensayos *in vitro*, validados internacionalmente, midiendo el daño en los niveles de: Mutación génica y/o Mutación cromosómica (Piloto *et al.*, 2009).

Uno de estos ensayos para la evaluación genotóxica es el de Micronúcleos con bloqueo de la citocinesis, el cual ha emergido como uno de los métodos preferidos para revelar el daño cromosómico ya que es posible medir roturas, rearrreglo y pérdida cromosómica, no disyunción, necrosis, apoptosis y efecto citostático (Fenech 2006, 2007; Roldán y Pérez, 2002). Los micronúcleos (MN) son pequeñas formaciones nucleares que se presentan además de los dos núcleos típicos que se forman en la telofase (Roldán y Pérez, 2002), se originan de fragmentos cromosómicos acéntricos o cromosomas enteros que han quedado rezagados en la anafase durante la división nuclear (Fenech 2006, 2007; Zalacain *et al.*, 2005). Este proceso puede ser inducido por agentes físicos o químicos (Di Giorgio *et al.*, 2003), capaces de producir efectos clastogénicos y aneugénicos (Di Giorgio *et al.*, 1996; Ergene *et al.*, 2007), motivo por el cual este ensayo se convierte en una herramienta útil para la evaluación de compuestos genotóxicos y monitoreo de poblaciones expuestas a carcinógenos ambientales (Humpage *et al.*, 2000).

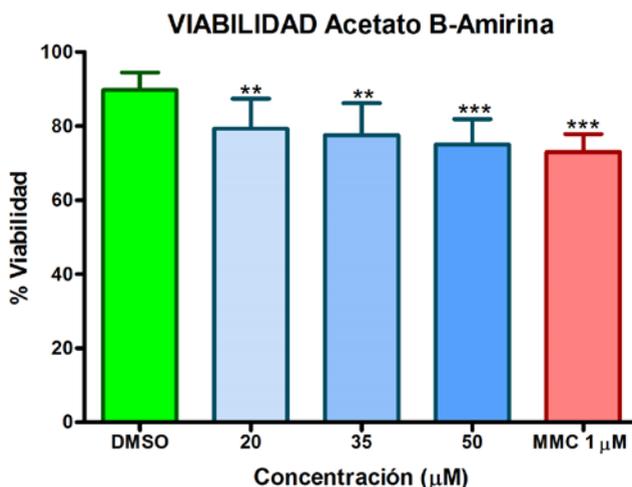
Mediante el CBMN es posible determinar el Índice de División Nuclear (IDN), el cual provee una medida del grado de

proliferación de la fracción celular viable. El IDN y la proporción de células binucleadas son indicadores de la respuesta mitógena de los linfocitos y del efecto citostático (medido por el grado de células mono, bi y polinucleadas) de los agentes utilizados en el ensayo (Fenech 2000, 2007).

Por lo que se evaluó el efecto de Acetato de β -Amirina y Dehidroleucodina en la cinética de proliferación celular (CPC) y en el cálculo del índice de división nuclear (IDN), como parámetros de citostaticidad. El modelo biológico empleado fue linfocitos humanos en proliferación cuya citocinesis ha sido inhibida con citocalasina B.

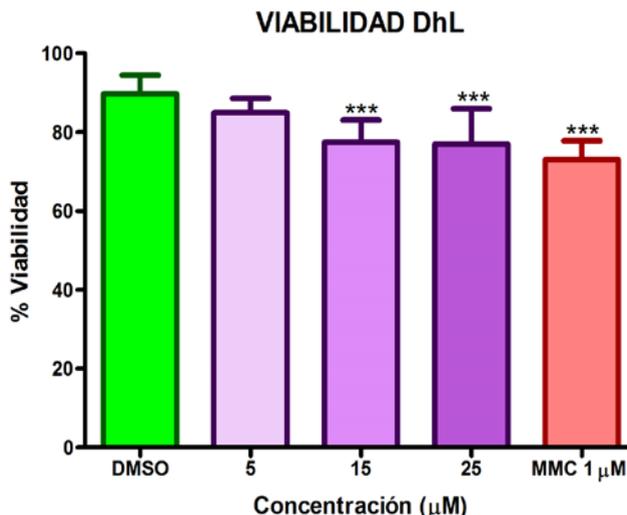
Para determinar el posible efecto citostático de un compuesto de prueba es importante que las células estén vivas, por lo que se determinó el efecto de Acetato de β -Amirina y Dehidroleucodina en la viabilidad de linfocitos en proliferación.

En la Gráfica 3.1., se observa el efecto dosis dependiente de Acetato de β -Amirina en la viabilidad celular a las concentraciones de 20, 35 y 50 μ M al incrementar la dosis.



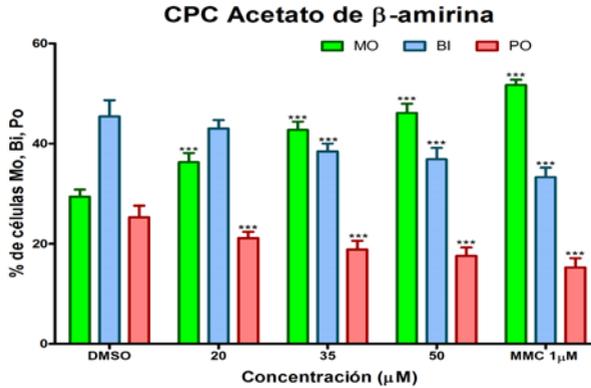
Gráfica 3.1. Porcentaje de Viabilidad de los linfocitos tratados con Acetato de β -Amirina a tres diferentes concentraciones. Los resultados se muestran como la media \pm EE de siete experimentos independientes que se realizaron por duplicado. *** $P < 0,0001$; ** $P < 0,0032$

Por otro lado, la viabilidad de los linfocitos humanos disminuyó con respecto al control negativo (DMSO) cuando se trataron a las concentraciones de 5, 15 y 25 μM con Dehidroleucodina (Gráfica 3.2). En ninguna de las concentraciones de ambas moléculas la viabilidad es menor al 70%, lo que nos demuestra que las dosis empleadas en el ensayo fueron subtóxicas.



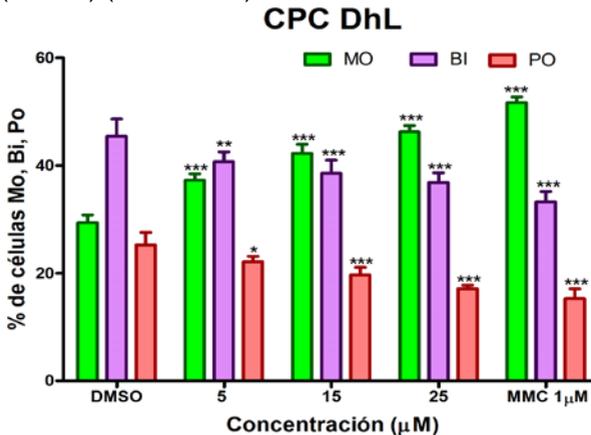
Gráfica 3.2. Efecto de la Dehidroleucodina en la viabilidad de los linfocitos tratados a tres diferentes concentraciones. Los resultados se muestran como la media \pm EE de siete experimentos independientes que se realizaron por duplicado. *** $P < 0,0001$

Los efectos sobre la proliferación celular se evaluaron por conteo de la proporción de linfocitos mono (MO), bi (BI) y polinucleados (PO). Así, se observó que Acetato de β -Amirina incrementó la proporción de linfocitos mononucleados y disminuyó la proporción de linfocitos bi y polinucleados (Gráfica 3.3). Estos efectos fueron dependientes de la concentración y significativamente diferentes al grupo control (DMSO).



Gráfica 3.3. Efecto de la molécula Acetatoβde -Amirina en la proliferación celular. Porcentaje de linfocitos Mono, Bi y Poli. La MMC se empleó como control positivo y DMSO como control negativo. Los resultados se muestran como la media ± EE de siete experimentos independientes que se realizaron por duplicado. Usamos T. de DUNETT. ***P<0,0001

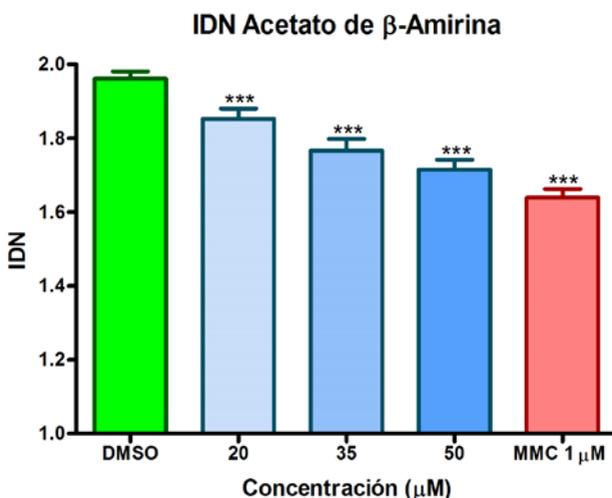
La molécula Dehidroleucodina también incrementó la proporción de linfocitos mononucleados y disminuyó la proporción de linfocitos bi y polinucleados. Estos efectos fueron dependientes de la concentración y significativamente diferentes al grupo control (DMSO) (Gráfica 3.4).



Gráfica 3.4. Efecto de la molécula Dehidroleucodina (DhL) en la proliferación celular. Porcentaje de células Mono, Bi y Poli. La MMC se empleó como control positivo y DMSO (0.5%) como control negativo. Los resultados se muestran como la media ± EE de siete experimentos independientes que se realizaron por duplicado. Usamos T. de DUNETT. ***P<0,0001.

Una vez que se obtuvo las proporciones de linfocitos mono, bi y polinucleados como resultado del tratamiento con Acetato de β -Amirina y Dehidroleucodina, se calculó el índice de división nuclear (IDN). Como se puede observar en la Gráfica 3.5. Acetato de β -Amirina presentó efecto citostático de manera dosis dependiente, siendo estadísticamente significativo con respecto al control negativo (DMSO). En estudios realizados por Gómez *et al.*, (1997, 2001) se ha demostrado el efecto citostático que tiene acetato de β -Amirina en las células Hep-2 y α -amirina en las células Hep-2 y McCoy.

Se ha evaluado la actividad citotóxica de los productos de Acetato de β -amirina, como el metabolito (3 β)-olean-12-ene-3,23-diol el cual mostró actividad citotóxica moderada en las líneas celulares HO-8910, HepG2 y SHG. Asimismo, erythrodiol mostró actividad citotóxica moderada para las líneas celulares HO-8910, SMMC 7721, T24 y SHG (Yang *et al.*, 2008).



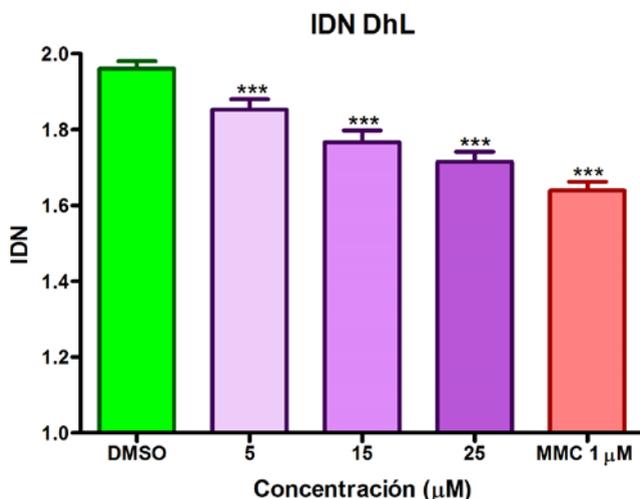
Gráfica 3.5. Índice de división nuclear calculado para los linfocitos tratados con Acetato de β -Amirina. La mitomicina C (MMC) se empleó como control positivo. Cada barra representa la media \pm EE de siete experimentos independientes por duplicado. *** $P < 0.0001$.

Por su parte, Dehidroleucodina presentó efecto citostático significativo en el modelo de prueba siendo este dosis dependiente (Gráfica 3.6). En estudios previos DhL (Cruzado *et al.*, 2005) y su derivado 11,13-dihidro-dehidroleucodina (2H-DhL) han demostrado tener un efecto antiproliferativo en células vasculares del músculo liso (VSMCs) (Polo *et al.*, 2007). Además, DhL es capaz de inhibir el crecimiento *in vitro* de *Trypanosoma cruzi* (Brengio *et al.*, 2000).

DhL y 11,13-dihidro-dehidroleucodina (2H-DhL) reducen la progresión del ciclo celular, debido a un arresto en G2 por inhibición de proteínas que participan directamente en la transición de G2 a M, como el factor complejo promotor de la mitosis. DhL puede interferir con la síntesis de ciclinas necesarias para la formación del complejo o inhibiendo la actividad fosforilante del factor promotor de la mitosis (Cruzado *et al.*, 2005; Polo *et al.*, 2007).

Se sugiere que la inhibición de la actividad mitótica de los linfocitos tiene lugar antes de empezar la mitosis. Por lo tanto, parece ser que los disturbios de la división celular resultan de alteraciones en la síntesis de ADN y ARN o de otros procesos metabólicos que involucran la síntesis de ácidos nucleicos (Picman 1986).

Debido a que el bloqueo de la citocinesis no afectó la cariocinesis fue posible determinar el índice de proliferación conocido como *Índice de División Nuclear* (IDN). Este parámetro ha sido propuesto como un indicador de proliferación celular y como una herramienta para el estudio de la actividad citostática de un compuesto de prueba (Fenech 2000, 2007).



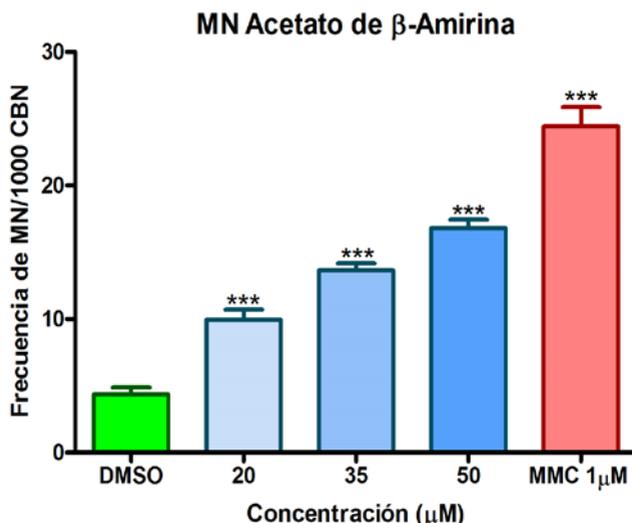
Gráfica 3.6. Índice de división nuclear calculado para los linfocitos tratados con Dehidroleucodina. La mitomicina C (MMC) se empleó como control positivo. Cada barra representa la media \pm EE de siete experimentos independientes por duplicado. *** $P < 0.0001$.

Por otro lado, se evaluó el efecto genotóxico de Acetato de β -Amirina y Dehidroleucodina determinado en función de la frecuencia de micronúcleos. Para ello, se empleó el modelo de linfocitos en proliferación cuya citocinesis se inhibió con la citocalasina B, bajo los lineamientos propuestos por Fenech (2007).

Como se puede ver en la Gráfica 3.7, Acetato de β -Amirina indujo un incremento estadísticamente significativo en la frecuencia de micronúcleos de los linfocitos binucleados. Esto nos indica que la molécula de prueba es capaz de provocar daño al ADN como resultado de eventos clastogénicos o aneugénicos.

En un estudio realizado por Celi (2009), se observó que Acetato de β -Amirina es capaz de producir daño al ADN de manera dosis dependiente a las concentraciones de 25, 35 y 45 μ M, medido mediante el ensayo cometa, otro test de genotoxicidad ampliamente utilizado por su sensibilidad para detectar daño genotóxico.

En el género *Clusia* se han identificado triterpenoides como α y β amirina, friedelina, aplotaxeno, ácido oleanólico, α y β friedelinol y el (17 α , 20R)-dammara-12,24-dien-3 β -ol (Mangas *et al.*, 2008). También mediante el ensayo cometa se ha demostrado que el extracto de *Clusia alata* causa un incremento del daño en el ADN en leucocitos de sangre periférica, así como un aumento significativo en el número de aberraciones cromosómicas en células de médula ósea de ratón (Moura *et al.*, 2008).



Gráfica 3.7. Efecto genotóxico en los linfocitos humanos expuestos a diferentes concentraciones de Acetato de β -Amirina. Se empleó como control positivo la mitomicina C (MMC 1 μM). Cada barra representa la media \pm EE de siete experimentos independientes por duplicado. *** $P < 0.0001$.

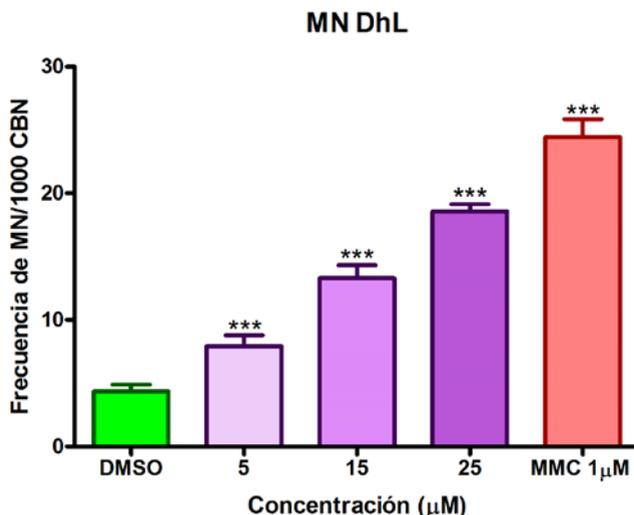
Las especies de este género producen un látex rico en benzofenonas polipreniladas, aunque también se hace referencia a otros metabolitos dentro de los cuales se encuentran los flavonoides, terpenos y esteroides, encontrándose un amplio rango de actividades biológicas y farmacológicas, como por ejemplo: actividad antiinflamatoria, antioxidante, antimicrobiana, quimiopreventiva del cáncer, anti-HIV (Aragao 2004; Gomes Da Camara *et al.*, 2002; Huerta-Reyes *et al.*, 2004; Mangas *et al.*, 2008; Moura *et al.*, 2008) y actividad citotóxica (Díaz-Carballo *et al.*, 2008; Yang *et al.*, 2008). Otros estudios en base a la amirina

y sus ésteres muestran otras actividades farmacológicas como: actividad anticonceptiva (Krogh *et al.*, 1999), antiartrítica (Kweifio-Okai *et al.*, 1994; Kweifio-Okai *et al.*, 1995) y citostática (Gómez *et al.*, 1997; Gómez *et al.*, 2001).

Poco se conoce acerca de los mecanismos de acción por los que los triterpenos ejercen sus efectos. La mayoría de los estudios farmacológicos se limitan a informar el parámetro de potencia (CI_{50} , concentración que inhibe el 50% de la proliferación celular) y a la comparación de este parámetro con aquellos previamente informados (Parra *et al.*, 2005).

Diversas investigaciones han demostrado que el ácido oleanólico, un triterpeno de tipo oleano (Acetato de -Amirina), posee actividad citotóxica sobre diferentes líneas celulares de cáncer. Además, este compuesto induce la diferenciación en líneas celulares de leucemia murina y humana. El ácido oleanólico inhibe las reacciones de adenilación y ligación catalizadas por la ligasa I del ADN humano. También, se conoce que inhibe la actividad de la polimerasa β del ADN de rata y que estimula la liberación de óxido nítrico (ON) y TNF- α , a través de la regulación de la expresión de la enzima óxido nítrico sintetasa y el factor de necrosis tumoral, por el factor nuclear κB (NF- κB). Se conoce que algunos triterpenos del tipo oleanano son inhibidores catalíticos de las topoisomerasas humanas; sin embargo, hasta el momento no se ha descrito la actividad citotóxica o antiproliferativa de dichos compuestos. Entre esos compuestos se pueden mencionar al ácido acetil- α -boswélico, al olean-12-en-3 β ,15 α -diol y al olean-12-en-3 β ,15 α ,24-triol. Asimismo, se sabe que los 3-p-cumaratos (cis y trans) del ácido oleanólico son capaces de inhibir la polimerasa del ADN (Parra *et al.*, 2005), de ahí la posibilidad de que haya un incremento de micronúcleos en células binucleadas en este estudio.

En cuanto a la actividad genotóxica de la molécula Dehidroleucodina (Gráfica 3.8) vemos que existe un incremento significativo de MN en CBN conforme aumenta la concentración.



Gráfica 3.8. Frecuencia de Micronúcleos en linfocitos humanos tratados con Dehidroleucodina a diferentes concentraciones. Se empleó como control positivo a la mitomicina C (MMC 1 μ M). Cada barra representa la media \pm EE de siete experimentos independientes por duplicado. ***P<0.0001.

En estudios previos con el extracto metanólico de *Gynoxis verrucosa* se observó un incremento significativo de MN en linfocitos humanos a la concentración de μ g/ml (Toledo 2007), efectos similares se obtuvo en la línea celular D-384 a las concentraciones de 10, 20 y 25 μ g/ml siendo en todas estadísticamente significativo el incremento de MN en células binucleadas (Herrera 2009).

De los metabolitos secundarios de *Gynoxis verrucosa* se han aislado lactonas sesquiterpénicas como: dehidroleucodina α ,1 10 α -epoxy-2 α -hidroxikauniolida, así como compuestos derivados del ácido bisabolánico (Malagón 2007).

El extracto de *A. douglasiana* y DhL han demostrado tener actividad antioxidante (María *et al.*, 2000; Correa *et al.*, 2001), antiinflamatoria (Guardia *et al.*, 2003), actividad inhibitoria del complejo aromatasa (P450) (Blanco *et al.*, 1997) y citostática (Cruzado *et al.*, 2005; Polo *et al.*, 2007).

Se ha reportado que las lactonas sesquiterpénicas interactúan con el ADN (Lee *et al.*, 1977), y que el daño irreversible producido por la DhL puede ser debido a una inhibición de la replicación del ADN (Bregio *et al.*, 2000).

Un amplio rango de actividades biológicas han sido descritas para estos compuestos (Picman 1986) como: actividad antimumoral (Lee *et al.*, 1977; Robles *et al.*, 1995), antimigraña (Beekman *et al.*, 1997), citoprotectora contra úlcera gástrica (Giordano *et al.*, 1992; Penissi *et al.*, 1998), analgésica, antipirética, antiinflamatoria (Morán, *et al.*, 1989), antimalárica (Rodríguez *et al.*, 2006), antibacteriana y antifúngica (Bruneton 2001). Asimismo, se ha demostrado que las lactonas sesquiterpénicas son inhibidoras de la contractibilidad del músculo liso (Hay *et al.*, 1994), de citocinas proinflamatorias (Hwang *et al.*, 1996), de la actividad de la aromatasa (Blanco *et al.*, 1997) y de la activación nuclear del Factor-kappa B (NF-kappa B) (Hehner *et al.*, 1998; Lyss *et al.*, 1998).

Estas actividades son mediadas principalmente por la función α -metilén- γ -lactona, que es un poderoso agente alquilante con la capacidad de unirse a grupos nucleofílicos como los sulfidrilos de la cisteína. Sin embargo, la actividad alquilante no es específica, conduciendo a la inhibición de enzimas y factores clave involucrados en los procesos biológicos (Polo *et al.*, 2007).

También se ha determinado la actividad antiproliferativa e inductora de apoptosis de la lactona sckhuriolida en cultivos *in vitro* de la línea celular Caski (Cancino *et al.*, 2007). Las lactonas sesquiterpénicas inhiben el crecimiento tumoral por una alquilación selectiva de macromoléculas biológicas reguladoras del crecimiento, tales como enzimas clave que controlan la división celular (Picman 1986).

Otras lactonas son capaces de afectar la formación del huso mitótico e incluso inducir amitosis. Se ha observado que partenina es capaz de dañar los cromosomas de linfocitos humanos, principalmente por causar roturas cromatídicas e isocromatídicas, además de inducir la formación de micronúcleos en eritrocitos de ratón Swiss (Picman 1986).

Los resultados obtenidos en el presente estudio corroboran lo expuesto anteriormente sobre las actividades de los triterpenos y las lactonas sesquiterpénicas, por lo que el incremento de la frecuencia de MN se puede deber al efecto de la actividad genotóxica de Acetato de β -Amirina y Dehidroleucodina, lo que sería importante determinar el origen clastogénico o aneugénico de los MN en linfocitos humanos.

Para concluir, es importante destacar a las plantas como punto de partida para la extracción y aislamiento de moléculas que pueden constituirse en nuevos agentes antineoplásicos, los cuales aportarían en gran medida con el tratamiento de una de las enfermedades que constituye la primera causa de muerte a nivel mundial, como es el cáncer. Lo que nos lleva a continuar investigando la actividad de sus metabolitos secundarios y aportar con resultados relevantes a la farmacología, mediante técnicas validadas a nivel internacional, como es el ensayo de micronúcleos con bloqueo de la citocinesis (CBMN), que nos permite establecer la capacidad antiproliferativa y genotóxica de una sustancia de prueba, además de ser una técnica práctica y accesible. Todo esto nos permitirá apoyar el uso tradicional de las plantas como fuente de actividades medicinales o a moderar su empleo para evitar efectos adversos que puedan repercutir en la salud de las personas en un futuro.

4. CONCLUSIONES

- Las concentraciones probadas de Acetato de β -Amirina y Dehidroleucodina no afectan la viabilidad de los linfocitos humanos, ya que se obtuvo una supervivencia mayor al 70%.
- La molécula Acetato de β -Amirina a las concentraciones de 20, 35 y 50 μ M presenta un efecto ~~ácido~~ citostático en linfocitos humanos evaluados mediante el índice de división nuclear.
- Dehidroleucodina a las concentraciones probadas de 5, 15 y 25 μ M presenta un efecto ~~citostático~~ citotóxico en linfocitos humanos evaluados mediante el índice de división nuclear.
- La molécula Acetato de β -Amirina induce daño genotóxico, medido en función de la frecuencia de micronúcleos con bloqueo de la citocinesis en linfocitos binucleados a las concentraciones de 20, 35 y 50 μ M.
- Dehidroleucodina a las concentraciones probadas de 5, 15 y 25 μ M es capaz de producir un efecto genotóxico en linfocitos humanos, medido en función de la frecuencia de micronúcleos en células binucleadas.

5. BIBLIOGRAFÍA

- Albertini RJ, Anderson D, Douglas GR, Hagmar L, Hemminki K, Merlo F, Natarajan AT, Norppa H, Shuker DE, Tice R, Waters MD, Aitio A, 2000. IPCS guidelines for the monitoring of genotoxic effects of carcinogens in humans. International Programme on Chemical Safety. *Mutat Res.* 463(2):111-72.
- Ansah Ch, Khan A, Gooderham N, 2004. In vitro genotoxicity of the West anti-malarial herbal *Cryptolepis sanguinolenta* and its major alkaloid cryptolepine. *Elsevier; Toxicology XXX.*
- Aragao G, 2004. Actividade antiinflamatória, antiagregante plaquetária e efeitos centrais de beta amirina isolada de *Protium heptaphyllum* Aubl March. Disertacao (Mestrado). Universidade Federal do Ceará. Programa de Pósgraduacao em Farmacologia.
- Arencibia D, Rosario L, 2009. Actualización sobre el ensayo cometa y de micronúcleos *in vitro*, Revista de Toxicología en línea (RETEL). La Habana, Cuba.
- Astudillo G, 2007. Estudio citotóxico de plantas medicinales de la Región Sur del Ecuador: *Bacharis latifolia*, *Callisia repens*, *Crotolaria ssp.*, *gynoxis verrucosa*, *ludwigia peruviana*, *Piper barbatum* y *Tagetes filifolia*, en la línea celular CHO K-1. Tesis de grado para la obtención del título de Bioquímico Farmacéutico. UTPL.
- Balunas M, Jones W, Chin Y, Mi Q, Farnsworth N, Soejarto D, Cordell G, Swanson S, Pezzuto J, Chai H, Kinghorn D, 2006. Relationships between Inhibitory Activity against a Cancer Cell Line Panel, Profiles of Plantas Collected, and Compound Classes isolated in an Anticancer Drug Discovery Project. *Chemistry and Biodiversity*. Vol.3: 897-915.
- Beekman A, Woerdenbag H, Van Uden W, Pras N, Konings A, Wikstrom H, Schmidt T, 1997. Structure-cytotoxicity relationships of some helenanolide-type sesquiterpene lactones. *J. Nat. Prod.* 60, 252–257.

- Blanco J, Gil R, Alvarez C, Patrino L, Genti-Raimondi S, Flury A, 1997. A novel activity for a group of sesquiterpene lactones: inhibition of aromatase. *FEBS Lett.* 409, 396–400.
- Brengio s, Belmonte S, Guerreiro E, Giordano O, Pietrobon E, Sosa M, 2000. The sesquiterpene lactone dehydroleucodine (DhL) affects the growth of cultured epismatigotes of *Trypanosoma cruzi*. *J. Parasitol.*, 86(2), 407-412.
- Brugés K, Reguero Ma. T, 2008. Evaluación preliminar de toxicidad, genotoxicidad y actividad antimicrobiana de *Sida rhombifolia* L. *Revista Colombiana de Biotecnología*, vol. IX, número 001, pp. 5-13.
- Bruneton J, 2001. *Farmacognosia*, Segunda ed. Editorial Acribia. Zaragoza-España.
- Brunton L, Lazo J, Parker K, 2007. *Goodman & Gilman: Las bases farmacológicas de la terapéutica*, undécima ed. McGraw Hill Interamericana Editores, S.A. de C.V.
- Cancino D, Cano A, Escobar M, Osorio S, Sánchez L, 2007. Efecto antiproliferativo y apoptótico de la lactona sckhuriolida en células provenientes de cáncer cervicouterino caski. 2º Congreso Nacional de Química Médica.
- Celi L, 2009. Evaluación del efecto genotóxico del extracto hexánico y los metabolitos secundarios de *clusia latipes* mediante el ensayo cometa y H2AX en linfocitos humanos. Tesis de grado para la obtención del título de Bioquímico Farmacéutico.
- Cruzado M, Castro C, Fernandez D, Gomez L, Roque M, Giordano O. E, Lopez L. A, 2005. Dehydroleucodine inhibits vascular smooth muscle cell proliferation in G2 phase. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*, 8;51(6):525-30.
- De la Rosa C, Márquez R, Mendoza D, Prieto P, Anillo G, 1990. Evaluación química y actividad biológica de los extractos de las hojas de *Thevetia ahouai* de la costa atlántica colombiana para determinar su actividad antiinflamatoria y antifúngica. [en línea]. Disponible en: <http://apolo.uniatlantico.edu.co:8091/uniatlantico/hermeso>

ft/portal/home_1/rec/arc_1990.doc. [consulta 03-06-2009]

- Di Giorgio M, Nasazzi N, Heredia M, Fernández J, 1996. Influencia de la edad, sexo y condiciones de estilo de vida sobre las frecuencias espontánea y radioinducida de micronúcleos en linfocitos humanos. Publicado en: Seguridad Radiológica Nº 14, pp. 27-32.
- Di Giorgio M, Sardi M, Busto E, Vallerga MB, Taja MR, 2003. Ensayo de micronúcleos en linfocitos humanos como biodosímetro de exposiciones in vivo agudas y crónicas. Presentado en: "VI Congreso Regional de Seguridad Radiológica y Nuclear".
- Díaz-Carballo D, Malak S, Bardenheuer W, Freistuehler M, Reush H, 2008. Cytotoxic activity of nemorosone in neuroblastoma cells. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 12(6b), 2598-608.
- Dupuy O, Murillo R, Bonilla J, 2008. Lactonas sesquiterpénicas de las plantas *Viguiera sylvatica* y *Decachaeta thieleana* (Asteraceae) modulan la producción de óxido nítrico y la fagocitosis de macrófagos RAW. *Rev. Biol. Trop. (Int. J. Trop. Biol. ISSN-0034-7744)* Vol. 56 (3): 1063-1073.
- Ergene S, Cavas T, Celik A, Köleli K, Aymak C, 2007. Evaluation of River Water Genotoxicity Using the Piscine Micronucleus Test. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 48:421-429.
- Fenech M, Neville S, Rinaldi J, 1994. Sex is an important variable affecting spontaneous micronucleus frequency in cytokinesis-blocked lymphocytes. *Mutation Research* 313: 203-207.
- Fenech M, 2000. The in vitro micronucleus technique. *Mutation Research* 455: 81-95.
- Fenech M, Chang WP, Kirsch-Volders M, Holland N, Bonassi S, Zeiger E, 2003. HUMN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures. *Mutation Research* 534: 65-75
- Fenech M, 2006. Cytokinesis-block micronucleus cytome assay involves into a "cytome" assay of chromosomal

- instability, mitotic dysfunction and cell death. *Mutation Research* 600: 58-66
- Fenech M, 2007. Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. *Nature protocols*. Vol. 2 No. 5.
 - Giordano O. S, Guerreiro E, Pestchanker M, Guzmán J, Pastor D, Guardia T, 1990. The gastric cytoprotective effect of several sesquiterpene lactones. *J. Nat Prod.* 53(4):803-9.
 - Giordano O, Pestchanker M, Guerreiro E, Saad J, Enriz R, Rodriguez A, Jauregui E, Guzman J, Maria A, Wendel G, 1992. Structure-activity relationship in the gastric cytoprotective effect of several sesquiterpene lactones. *J. Med. Chem.* 35, 2452–2458.
 - Gomes da Camara C, Kiszczarff S, Regina D, 2002. Análise química da cultura de tecidos do híbrido *Clusia paralicola* X *Clusia weddelliana*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, pp. 26-28.
 - Gómez B, Zúñiga G, 2007. Genotoxicidad y potencial teratogénico. *Revista de divulgación científica y tecnológica de la Universidad Veracruzana*. Volmen XX, número 3.
 - Gómez M, Sáenz M, García M, Ahumada M, De la Puerta R, 1997. Cytostatic activity against Hep-2 cells of metanol extracts from *Viscum cruciatum* Sieber parasitic on *Crataegus monogyna* Jacq. And two isolated principles, *Phytotherapy Research*, pp. 240-242.
 - Gómez M, García M, Sáenz M, Ahumada M, Aznar J, 2001. Cytostatic Activity of *Achillea ageratum* Against Cultured Hep-2 and McCoy Cells. *Pharmaceutical Biology*, Vol. 39, No. 1, pp. 79–81.
 - Guardia T, Juarez A, Guerreiro E, Guzmán J, Pelzer L, 2003. Anti-inflammatory activity and effect on gastric acid secretion of dehydroleucodine isolated from *Artemisia douglasiana*. *J Ethnopharmacology*, 88, 195-198.
 - Hay A, Hamburger M, Hostettmann K, Houlst J, 1994. Toxic inhibition of smooth muscle contractility by plant-derived sesquiterpenes caused by their chemically reactive alpha-methylenebutyrolactone functions. *Br. J. Pharmacol.* 112, 9–12.

- Hehner S, Heinrich M, Bork P, Vogt M, Ratter F, Lehmann V, Schulze-Osthoff K, Droge W, Schmitz M, 1998. Sesquiterpene lactones specifically inhibit activation of NF-kappa B by preventing the degradation of I kappa B-alpha and I kappa B-beta. *J. Biol. Chem.* 273, 1288–1297.
- Hernández A, Madrigal E, De la Cruz C, 2002. Inhibitory effect of chamomile essential oil on the sister chromatid exchanges induced by daunorubicin and methyl methanesulfonate in mouse bone marrow. *Toxicology Letters*, 135: 103-110.
- Herrera D, 2009. Evaluación genotóxica del extracto metanólico de *Gynoxis verrucosa* mediante el ensayo CBMN en la línea celular Astrocitoma cerebral (D384). Tesis de grado para la obtención del título de Bioquímico Farmacéutico.
- Huerta-Reyes M, Basualdo M, Lozada L, Jiménez M, Soler C, Reyes R, 2004. HVI-1 Inhibition by extracts of Clusiaceae Species from Mexico. *Biol. Pharm. Bull.* 27(6) 916-920.
- Humpage A, Fenech M, Thomas P, Falconer I, 2000. Micronucleus induction and chromosome loss transformed human white cells indicate clastogenic and aneugenic action of the cyanobacterial cylindrospermopsin. *Mutation Research*, 472: 155-161.
- Hwang D, Fischer N, Jang B, Tak H, Kim J, Lee W, 1996. Inhibition of the expression of inducible cyclooxygenase and proinflammatory cytokines by sesquiterpene lactones in macrophages correlates with the inhibition of MAP kinases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 226,810–818.
- Jones K, Senft J, 1985. An Improved method to determine cell viability by simultaneous staining with fluorescein diacetate- propidium iodide. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry.* 33: 77-79.
- Kasper D, Braunwald E, Fauci A, Hauser S, Longo D, Jameson L, 2006. Principios de medicina interna, 16^a ed. McGraw Hill Interamericana Editores, S.A. de C.V.
- Kinghorn A, Farnsworth N, Soejarto D, Cordell G, Swanson S, Pezzuto J, Wani M, Wall M, Oberlies N, Kroll

- D, Kramer R, Rose W, Vite G, Fairchild C, Peterson R, Wild R, 2003. Novel Strategies for the Discovery of Plant-Derived Anticancer Agents. *Pharmaceutical Biology*, Vol. 41, Supplement, pp. 53–67.
- Kirsch-Volders M, Sofuni T, Aardema M, Albertini S, Eastmond D, Fenech M, Ishidate M, Lorge E, Norppa H, Surrallés J, Hude W, Wakata A, 2000. Report from the In Vitro Micronucleus Assay Working Group. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 35:167-172.
 - Klaassen C, Watkins J, 2005. Casarett y Dooll Fundamentos de Toxicología, edición en español. McGraw Hill Interamericana Editores, S.A.U., Aravaca (Madrid).
 - Krogh R, Kroth R, Berti C, Madeira A, Souza M, Cechinel-Filho V, Dell-Monache F, Yunes R, 1999. Isolation and identification of compounds with anticonceptive action from *Ipomoea pes-capre* (L) R. Br., *Pharmazie.*, Vol. 54, n.6, pp. 464-466.
 - Kweifio-Okai G, De Munk F, Rumble B, Macrides T, Cropley M, 1994. Antiarthritic mechanism of amyrin triterpenes, *Res. Commun. Mol. Pathol. Pharmacol.*, Vol. 85, n. 1, pp. 45-55.
 - Kweifio-Okai G, Bird D, Field B, Ambrose R, Carrol A, Smith P, Valdes R, 1995. Anti-inflammatory activity of a Ghanaian antiarthritic herbal preparation: III., *J. Ethnopharmacology.*, Vol. 46, n.1, pp.7-15, 1995.
 - Lechuga J, 1995. Cultivos de tejidos vegetales en *Artemisia absinthium* L. (Asteraceae). Tesis para obtener el grado de Maestro en Biología Experimental. Universidad Autónoma Metropolitana Iztaapalapa, División de Ciencia Biológicas y de Salud, México, D.F.
 - Lee K, Hall I, Mar E, Starnes Ch, ElGebaly S, Waddell T, Hadgraft R, Ruffner Ch, Weidner I, 1977. Sesquiterpene Antitumor Agents: Inhibitors of Cellular Metabolism. *Science, New Series*, Vol. 196, No. 4289, pp. 533-536
 - López E, 2007. Estudio fitoquímico y aproximación genética en especies de la sección *Plinthine* del género *Arenaria* (Caryophyllaceae). Tesis Doctoral. Universidad de Granada.

- Lyss G, Knorre A, Schmidt T, Pahl H, Merfort I, 1998. The anti-inflammatory sesquiterpene lactone helenalin inhibits the transcription factor NF-kappaB by directly targeting p65. *J. Biol. Chem.* 273, 33508–33516.
- Malagón O, 2007. Evaluación e identificación de sustancias antimicrobianas y antitumorales a partir de plantas medicinales y hongos del Sur del Ecuador. Informe anual del proyecto.
- Mangas R, Montes de Oca R, Bello A, Nival A, 2008. Caracterización por Cromatografía de Gases/Espectrometría de Masas del Extracto Apolar de las Hojas de *Clusia minor* L. *Lat. Am. J. Pharm.* 27 (5): 747-51.
- María A, Repetto M, Llesuy S, Giordano O, Guzmán J, Guerreiro E, 2000. Antioxidant Activity of *Artemisia douglasiana* Besser Extract and Dehydroleucodine. *Phytother. Res.* 14, 558–560.
- Martínez V, 2005. Biomonitorización genotóxica de poblaciones humanas expuestas ambientalmente al arsénico. Tesis doctoral, Universidad Autónoma de Barcelona. Facultat de Ciències, Departament de Genètica i de Microbiologia, Grup de Mutagènesi.
- Mauteca R, Lombaert N, Aka P, Decordier I, Kirsch-Volders M, 2006. Chromosomal changes: induction, detection methods and applicability in human biomonitoring. *Biochimie.*
- Montero R, Serrano L, Ostrosky P, 1997. In vitro induction of micronuclei in lymphocytes: the use of bromodeoxyuridine as a proliferation marker. *Mutation Research*, 391, 135-141.
- Morán A, Martín M, Montero M, Ortiz de Urbina A, Sevilla M, San Román L, 1989. Analgesic, antipyretic and anti-inflammatory activity of the essential oil of *Artemisia caerulescens* subsp. *gallica*. *J. Ethnopharmacology* 27:301-317.
- Moura A, Perazzo F, Maistro E, 2008. The mutagenic potential of *Clusia alata* (Clusiaceae) extract based on two short-term *in vivo* assay. *Genet. Mol. Res.* 7(4): 1360-1368.

- Noel S, Kasinathan M, Rath S, 2006. Evaluation of apigenin using in vitro cytochalasin blocked micronucleus assay. Elsevier; Toxicology in Vitro 20: 1168-1172
- Oliveira F, 2005. Estudo das propriedades farmacológicas da resina de *Protium heptaphyllum* (Aubl.) March. e de seus principais constituintes, mistura de α - e β -amirina. Tese (Doutorado). Universidad Federal do Ceará. Curso de Pós-graduação em Farmacologia.
- Ordóñez P, Quave C, Malagón O, Varughese K, Smeltzer M, Compadre C, 2009. Antimicrobial activity against MRSA and MRSE and molecular structure of dehydroleucodine isolated from the Ecuadorian plant *Gynoxys verrucosa*, Wedd. Presentación de poster en el 36 th MALTO Meeting. Memphis, USA.
- Parra H, García F, Sordo M, Ramírez T, Martínez M, Ostrosky P, 2005. Evaluation of the cytotoxicity, cytostaticity and genotoxicity of Argentatina A and Argentatina B from *Parthenium argentatum* (Gray). *Life Sciences* 77, 2844-2865.
- Paz-y-Miño C, Creus A, Cabré O, Leone P, 2003. Genética Toxicológica y Carcinogénesis, BID-FUNDACYT-PUCE, Quito-Ecuador.
- Penissi A, Fogal T, Guzman J, Piezzi R, 1998. Gastroduodenal mucosal protection induced by dehydroleucodine: mucus secretion and role of monoamines. *Dig. Dis. Sci.* 43, 791–798.
- Picman A, 1986. Biological Activities of Sesquiterpene Lactones. *Biochemical Systematics and Ecology*, Vol. 14, No. 3, pp. 255-281.
- Piloto J, Vizoso A, Ramos A, García A, Remigio A, Vega Y, Lidia M, Rodríguez C, Carballo C, 2009. Plantas medicinales. Diez años de evaluaciones toxicogenéticas en el CIDEM. Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas, 8 (5), 428 - 434 BLACPMIA ISSN 0717 7917. La Habana, Cuba.
- Polo L, Castro C, Cruzado M, Collino C, Cuello-Carrión F, Ciocca D, Giordano O, Ferrari M, López L, 2007. 11, 13-dihydro-dehydroleucodine, a derivative of

- dehydroleucodine with an inactivated alkylating function conserves the anti-proliferative activity in G2 but does not cause cytotoxicity. *Journal of Pharmacology* 556 (2007) 19–26.
- Qureshi S, Ageel A, Al-Yahya M, Tariq M, Mossa J, Shah A, 1990. Preliminary toxicity studies on ethanol extracts of the aerial parts of *Artemisia abyssinica* and *A. inculta* in mice. *J. Ethnopharmacology* 28: 157-162
 - Remigio A, Vega Y, Piloto J, Rodríguez J, 2008. Genotoxicidad de *Justicia pectoralis* Jacq. (tilo). Centro de Investigación y Desarrollo de Medicamentos (CIDEM), La Habana, Cuba.
 - Robles M, Aregullin M, West J, Rodríguez E, 1995. Recent studies on the zoopharmacognosy, pharmacology and neurotoxicology of sesquiterpene lactones. *Planta Med.* 61, 199–203.
 - Rodríguez M, Martínez J, Rivero L, Álvarez H, Valdez A, Rodríguez D, Lizama R, Payrol J, 2006. Evaluación de la actividad antimalárica de algunas plantas utilizadas en la medicina tradicional cubana. *Rev. Cienc. Farm. Básica Apl.*, Vol. 27, n.3, pp. 197-205.
 - Roldán E, Pérez A, 2002. Evaluación de micronúcleos en cultivo de Linfocitos humanos tratados con Casiopeína igly; UNIGEN, UNAM, México D.F., 2° Congreso Nacional de Química Médica
 - Rosellón A, 2005. Nuevas estrategias sintéticas hacia triterpenos irregulares y cromano derivados. Tesis Doctoral. Universidad de Granada.
 - Sánchez-Lamar A, Cápiro N, Fonseca G, 1998. Evaluación in vitro e in vivo de las propiedades genotóxicas de la especie endémica *Phyllanthus orbicularis* Hbk. *Rev. Cubana Invest Biomed*, 18(1):16-8.
 - Sánchez-Lamar A, Fiore M, Cundari E, Ruggero R, Cozzi R, De Salvia R, 1999. *Phyllanthus orbicularis* Aqueous Extract: Cytotoxic, Genotoxic and Antimutagenic Effects in the CHO Cell Line. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 161, 231-239.

- Serrano L, Montero R, 2001. Micronuclei and Chromatid Buds Are the Result of Related Genotoxic Events. *Environmental and Molecular Mutagenesis*. 38: 38-41
- Shyng-Shiou F, 2006. Selective cytotoxicity of squamocin on T24 bladder cancer cell at the S phase via Bax-, Bad-, and caspase-3-related pathways. *Life Sciences*. 78, 869-874.
- Tene V, Malagón O, Vita Finzi P, Vidari G, Armijos Ch, Zaragoza T, 2007. An ethnobotanical survey of medicinal plants used in Loja and Zamora-Chinchipec, Ecuador. *J Ethnopharmacology*, 111, 63-81.
- Toledo Z, 2007. Evaluación genotóxica del extracto metanólico de *Gynoxis verrucosa* mediante el ensayo CBMN en linfocitos humanos. Tesis de grado para la obtención del título de Bioquímico Farmacéutico.
- Uday M, Bussmann R, 2004. Distribución florística del bosque de neblina montano en la Reserva Tapichalaca, Cantón Palanda. Provincia de Zamora. *Lyonia a journal of ecology and application*. Vol 7; 91 – 98.
- Vlasáková B, Kalinova B, Gustafsson M, Teichert H, 2008. Cockroaches as Pollinators of *Clusia* aff. *sellowiana* (Clusiaceae) on Inselbergs in French Guiana. *Annals of Botany* 102: 295–304.
- Wojda a, Zietkiewicz E, Witt M, 2007. Effects of age and gender on micronucleus and chromosome nondisjunction frequencies in centenarians and younger subjects. *Mutagenesis* pp. 1–6
- Yang G, Zhang Z, Bai H, Gong J, Wang Y, Li B, Li J, 2008. Biotransformation of β -Amyrin Acetate by *Rhodobacter sphaeroides*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. Vol.105, No. 5, 558-561.
- Zalacain M, Sierrasesumaga L, Patino A, 2005. El ensayo de micronúcleos como medida de inestabilidad genética inducida por agentes genotóxicos. *Anales Sis San Navarra*, vol.28, n.2, pp. 227-236

