



# UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA

*La Universidad Católica de Loja*

## ÁREA BIOLÓGICA

### TITULACIÓN DE BIOQUÍMICO Y FARMACÉUTICO

**“Evaluación del efecto genotóxico de los derivados de la Argentatina B ((16 $\beta$ , 24R)-16,24-epoxi-25-hidroxicloartan-3-ona): 2 $\alpha$ - Bromo-(16 $\beta$ , 24R)-16,24-epoxi-25-hidroxicloartan-3-ona, (16 $\beta$ ,24R)-16,24-epoxi-25-hidroxicloartan-1en-3-ona, (16S,17R,20S)-3-oxo-25-nor-cicloartan-16,24 lactona, en linfocitos humanos mediante el Ensayo Cometa”**

TRABAJO DE FIN DE TITULACIÓN

**AUTORA:** Estrada Estrada, Gabriela Paulina

**DIRECTORA:** Ramírez Orellana, María Isabel, Mgs.

**LOJA – ECUADOR**

**2014**

## **APROBACIÓN DEL TRABAJO DE FIN DE TITULACIÓN**

Magister

María Isabel Ramírez Orellana

**DIRECTORA DEL TRABAJO DE FIN DE TITULACIÓN**

### **De mi consideración:**

El presente trabajo de fin de titulación: "Evaluación del efecto genotóxico de los derivados de la Argemone B ((16 $\beta$ , 24R)-16,24-epoxi-25-hidroxicicloartan-3-ona): 2 $\alpha$ - Bromo-(16 $\beta$ , 24R)-16,24-epoxi-25-hidroxicicloartan-3-ona, (16 $\beta$ ,24R)-16,24-epoxi-25-hidroxicicloartan-1-en-3-ona, (16S,17R,20S)-3-oxo-25-nor-cicloartan-16,24 lactona, en linfocitos humanos mediante el Ensayo Cometa", realizado por el profesional en formación: Gabriela Paulina Estrada Estrada; ha sido orientado y revisado durante su ejecución, por cuanto se aprueba la presentación del mismo.

Loja, Marzo del 2014.

f).....

Mgs. María Isabel Ramírez O.

**Directora del Trabajo de Fin de Titulación**

## DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS

“Yo, Gabriela Paulina Estrada Estrada declaro ser autor (a) del presente trabajo de fin de titulación: “Evaluación del efecto genotóxico de los derivados de la Argentatina B ((16 $\beta$ , 24R)-16,24-epoxi-25-hidroxicicloatan-3-ona): 2 $\alpha$ - Bromo-(16 $\beta$ , 24R)-16,24-epoxi-25-hidroxicicloartan-3-ona, (16 $\beta$ ,24R)-16,24-epoxi-25-hidroxicicloartan-1en-3-ona, (16S,17R,20S)-3-oxo-25-nor-cicloartan-16,24 lactona, en linfocitos humanos mediante el Ensayo Cometa” de la Titulación de Bioquímica y Farmacia, siendo la Mgs. María Isabel Ramírez Orellana la directora del presente trabajo, y eximo expresamente a la Universidad Técnica Particular de Loja y a sus representantes legales de posibles reclamos o acciones legales. Además certifico que las ideas, conceptos, procedimientos y resultados vertidos en el presente trabajo investigativo, son de mi exclusiva responsabilidad.

Adicionalmente declaro conocer y aceptar la disposición del Art. 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 investigaciones, trabajos científicos o técnicos y tesis de grado que se realicen a través, o con el apoyo financiero, académico o institucional (operativo) de la Universidad”

f.....

Gabriela Paulina Estrada Estrada

Cédula: 1104266737

## DEDICATORIA

El presente proyecto de investigación está dedicado primeramente a Dios, por todas las bendiciones que me ha dado y por poner a las personas indicadas en mi camino para culminar con éxito este trabajo.

A mi esposo Rúben por su paciencia y amor, a mis hijos Valentina, Joaquín, Sara, Marco, Salomé y a mi angelito que tengo en el cielo.

En especial a mis queridos padres Alonso, Libia, mis hermanos Edwin y Cecibel y mis sobrinos; por su apoyo incondicional en todas las etapas de mi vida. Y en general a toda mi familia que de una u otra forma me ayudaron a cumplir mis objetivos.

## **AGRADECIMIENTO**

A la Universidad Técnica Particular de Loja, en la persona del Ph. Dr. José Barbosa, por su interés en la formación de cada uno de los estudiantes no solo a nivel profesional si no también a nivel espiritual.

A la Titulación de Bioquímica y Farmacia, bajo la Dirección del Mgs. Luis Cartuche, por estar siempre dispuesto a aclarar cualquier duda en pro del desarrollo de la misma.

Al Centro de Biología Celular y Molecular, por permitirme realizar el proyecto de fin de carrera y de esta manera desarrollar mis conocimientos y destrezas en este departamento.

Al área de Genética Toxicológica por ayudarme a mejorar mis conocimientos así como también a mis compañeros, especialmente a Glenda, Diego, Gabriela, Luis, Javier y Henry quienes siempre estuvieron prestos a colaborar en la realización del trabajo de investigación.

A la Dra. Natalia Bailón M, por su asesoramiento, así como también por su comprensión y estímulo en el desarrollo de las diferentes aptitudes.

A la Mgs. María Isabel Ramírez, por su predisposición para aclarar cualquier duda y por sus acertadas recomendaciones para dar solución a los diferentes problemas que se presentaron en el momento.

A todos los compañeros del Centro de Biología Celular y Molecular por su apoyo desinteresado y su ayuda con el fin de obtener los mejores resultados en este trabajo de fin de titulación.

## INDICE DE CONTENIDOS

<b>CERTIFICACIÓN</b> .....	ii
<b>DECLARACIÓN DE AUTORIA Y CESIÓN DE DERECHOS</b> .....	iii
<b>DEDICATORIA</b> .....	iv
<b>AGRADECIMIENTO</b> .....	v
<b>ÍNDICE DE CONTENIDOS</b> .....	vi
<b>INDICE DE FIGURAS</b> .....	viii
<b>ÍNDICE DE TABLAS</b> .....	viii
<b>ÍNDICE DE FOTOGRAFÍAS</b> .....	viii
<b>ÍNDICE DE GRAFICAS</b> .....	viii
<b>ABREVIATURAS</b> .....	x
<b>RESUMEN</b> .....	1
<b>BSTRACT</b> .....	2
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	3
 <b>CAPÍTULO I. MARCO TEÓRICO</b>	
1.1. Genotóxicidad.....	6
1.2. Carcinogénesis.....	7
1.2.1. Clasificación de los Carcinógenos.....	8
1.3. Biomarcadores.....	9
1.3.1. Biomarcados de Exposición.....	9
1.3.2. Biomarcadores de Susceptibilidad.....	9
1.3.3. Biomarcadores de respuesta (o efecto).....	10
1.4. Ensayo Cometa Alcalino.....	11
1.4.1. Ventajas del Ensayo Cometa.....	12
1.4.2. Desventajas del Ensayo Cometa.....	13
1.4.3. Aplicación del Ensayo Cometa.....	13
1.5. La Biodiversidad: Una fuente de compuestos activos.....	14
1.6. Los Triterpenos.....	14
1.7. Argentatina A y B.....	15
1.8. Derivados de la Argentatina B:.....	16
2 $\alpha$ - Bromo-(16 $\beta$ , 24R)-16,24-epoxi-25-hidroxicicloartan-3-ona, (16 $\beta$ ,24R)-16,24-	

epoxi-25-hidroxicicloartan-1en-3-ona, (16S, 17R, 20S)-3-oxo-25-nor-cicloartan-16,24 lactona.

## **CAPÍTULO II. FIN DE PROYECTO**

2.1.	Objetivo General del Proyecto.....	20
2.2.	Objetivos Generales del Proyecto.....	20

## **CAPÍTULO III. METODOLOGÍA**

3.1.	Modelo Biológico.....	22
3.2.	Donantes.....	22
3.3.	Compuestos de Prueba.....	22
3.4.	Controles.....	22
3.4.1.	Control Positivo.....	22
3.4.2.	Control Negativo.....	23
3.5.	Ensayo de Viabilidad (FDA) y Ensayo Cometa.....	23
3.6.	Protocolo del Ensayo Cometa.....	25
3.7.	Análisis Estadístico.....	26
3.7.1.	Viabilidad FDA.....	26
3.7.2.	Ensayo Cometa.....	26

## **CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

4.1.	Viabilidad Celular.....	29
4.1.1.	Viabilidad con 2 $\alpha$ - Bromo-(16 $\beta$ , 24R)-16,24-epoxi-25-hidroxicicloartan-3-ona	30
4.1.2.	Viabilidad con (16 $\beta$ ,24R)-16,24-epoxi-25-hidroxicicloartan1en-3-ona.....	30
4.1.3.	Viabilidad con (16S, 17R, 20S)-3-oxo-25-nor-cicloartan-16,24 lactona....	31
4.2.	Largo de Cola con los derivados de La Argentatina B.....	33
4.2.1.	Largo de Cola con 2 $\alpha$ - Bromo-(16 $\beta$ , 24R)-16,24-epoxi-25-hidroxicicloartan-3-ona	33
4.2.2.	Largo de cola con (16 $\beta$ ,24R)-16,24-epoxi-25-hidroxicicloartan1en-3-ona	34
4.2.3.	Largo de cola con (16S, 17R, 20S)-3-oxo-25-nor-cicloartan-16,24 lactona	34
4.3.	Comparación cualitativa de los derivados de Argentatina B: 2 $\alpha$ - Bromo-(16 $\beta$ , 24R)-16,24-epoxi-25--hidroxicicloartan-3-ona,	35

(16 $\beta$ ,24R)-16,24-epoxi-25-hidroxicicloartan-1en-3-ona y (16S, 17R, 20S)-3-oxo-25-nor-cicloartan-16,24 lactona

## **CAPITULO V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES**

CONCLUSIONES.....	39
RECOMENDACIONES.....	40

<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>41</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>47</b>

### **ÍNDICE DE FIGURAS**

<b>Figura 1.</b> Formación de la cola del cometa.....	11
<b>Figura 2.</b> Estructura molecular de la Argentatina B.....	15
<b>Figura 3.</b> Fórmula estructural del Etil Metano Sulfonato (EMS).....	23
<b>Figura 4.</b> . Imagen del ensayo de viabilidad.....	25

### **ÍNDICE DE TABLAS**

<b>Tabla 1.</b> Clasificación de los carcinógenos según la IARC.....	8
<b>Tabla 2.</b> Actividad citotóxica de los derivados de la Argentatina B.....	17
<b>Tabla 3.</b> Derivados de la argentatina B.....	18
<b>Tabla 4.</b> Diseño del tratamiento para viabilidad y ensayo cometa.....	24

### **INDICE DE FOTOGRAFÍAS**

<b>Fotografía 1.</b> Cometa con su cabeza y cola.....	12
<b>Fotografía 2.</b> <i>Parthenium Argentatum</i> .....	15

## ÍNDICE DE GRÁFICAS

<b>Gráfica 1.</b> Viabilidad con 2 $\alpha$ - Bromo-(16 $\beta$ , 24R)-16,24-epoxi-25-hidroxicicloartan-3-ona	30
<b>Gráfica 2.</b> Viabilidad con (16 $\beta$ ,24R)-16,24-epoxi-25-hidroxicicloartan-1en-3-ona	31
<b>Gráfica 3.</b> Viabilidad con (16S, 17R,20S)-3-oxo-25-nor-cicloartan-16,24 lactona	32
<b>Gráfica 4.</b> Largo de Cola con 2 $\alpha$ - Bromo-(16 $\beta$ , 24R)-16,24-epoxi-25- hidroxicicloartan-3-ona.	33
<b>Gráfica 5.</b> Largo de Cola con (16 $\beta$ ,24R)-16,24-epoxi-25-hidroxicicloartan-1en-3-ona	34
<b>Gráfica 6.</b> Largo de Cola con (16S,17R,20S)-3-oxo-25-nor-cicloartan-16,24 lactona	35
<b>Gráfica 7.</b> Comparación cualitativa de los derivados de Argentatina B 2 $\alpha$ - Bromo-(16 $\beta$ , 24R)-16,24-epoxi-25--hidroxicicloartan-3-ona, (16 $\beta$ ,24R)-16,24-epoxi-25-hidroxicicloartan-1en-3-ona y (16S, 17R, 20S)-3-oxo-25-nor-cicloartan-16, 24 lactona.	36

## ABREVIATURAS

**AND:** Ácido Desoxiribonucleico

**EMS:** etil metanosulfonato

**IARC:** International Agency for Research on Cancer

**UV:** Radiaciones ultraviolet

**RFLPs:** Fragmentos de restricción

## RESUMEN

En la actualidad las principales características que se busca en un fármaco es que tenga bajos niveles de citotoxicidad y principalmente de genotoxicidad, debido a esto, se ha realizado diversos estudios en busca de nuevos principios activos obtenidos a partir de plantas, como es el caso de la Argentatina B que es uno de los principales componentes de la resina del *Partenium argentatum*, Gray (guayule) que es un arbusto productor de hule natural. A partir de este se han obtenido varios derivados, entre los cuales tenemos la (16S,17R,20S)-3-oxo-25-nor-cicloartan-16,24 lactona, 2 $\alpha$ - Bromo-(16 $\beta$ , 24R)-16,24-epoxi-25-hidroxicicloartan-3-ona, (16 $\beta$ ,24R)-16,24-epoxi-25-hidroxicicloartan-1en-3-ona; a los cuales en el presente proyecto se evaluó el nivel de daño que producen en el ADN, mediante el ensayo cometa en linfocitos humanos, este ensayo es un método muy sensible, y relativamente económico. Nuestros resultados mostraron que el 2 $\alpha$ - Bromo-(16 $\beta$ , 24R)-16,24-epoxi-25-hidroxicicloartan-3-ona fue el más genotóxico seguido del (16 $\beta$ ,24R)-16,24-epoxi-25-hidroxicicloartan-1en-3-ona y el menos genotóxico resulto la (16S,17R,20S)-3-oxo-25-nor-cicloartan-16,24 lactona.

**PALABRAS CLAVE:** Derivados de la Argentatina B, genotoxicidad, *Partenium argentatum*, Gray (guayule), Ensayo Cometa.

## ABSTRACT

Due to that nowadays the human being face new diseases of the result of the new life conditions, the research of pharmacological treatments has been routed to the large amount of biodiversity that exist in our environment; besides, this research also has the aim to reduce the damage that secondary effects produce to the organism, as well know the relationship that exist between the chemical structure and the biological activity of some secondary metabolites; the Argentatine B a triterpene isolated of *Parthenium Argentatum* has chemically changed, and several derivatives had obtain. In this project the genotoxic activity of the three of those derivatives has been researched, through to the comet assay in human lymphocytes. We had obtained as a result that the most active derivative was 2 $\alpha$ - Bromo-(16 $\beta$ , 24R)-16,24-epoxi-25-hidroxicicloartan-3-one and the (16S,17R,20S)-3-oxo-25-nor-cicloartan-16,24 lactone was the least genotoxic of the three.

**Key Words:** comet assay, genotoxicity, Argentatine B derivates.

## INTRODUCCIÓN

Actualmente la investigación de fármacos de origen natural es una prioridad, debido a que se tiene un gran campo de investigación en la búsqueda de tratamientos efectivos para enfermedades como el sida y el cáncer que tienen una gran importancia tanto económica como social (Ashis K. et al, 2001). En cuanto a éste último se conoce que se produce por múltiples razones entre las cuales tenemos el medioambiente, el estilo de vida y la herencia genética (Peto, 2001). Las mutaciones que llegan a afectar a los genes pueden proceder de varias fuentes, ya sean químicas o físicas y se los denomina carcinógenos. Debido a esto el término genotóxico empezó a ser utilizado de una manera cada vez más extendida sobre la relación de la inducción de cáncer y daño genético (Paz y Miño, 2002).

La genotoxicidad es el proceso por el cual un agente produce un efecto deletéreo sobre el ADN y otros blancos celulares que controlan la integridad del material genético (Gollapudi, 2000). Se denominan genotóxicos a aquellos agentes que producen alteraciones estructurales en el material hereditario, éstos pueden ser, tanto exógenos como endógenos, y operan de distintos modos sobre la molécula de ADN (Pérez, 2002)

El estudio sistemático de plantas con antecedentes etnomédicos ha conducido frecuentemente al aislamiento de diversos triterpenos biodinámicos. Así se conocen triterpenos antioxidantes (Zhu *et al.*, 1999) antiinflamatorio (Marquina *et al.*, 2002), hepatoprotectores (Liu *et al.*, 1995), antiproliferativos (Li *et al.*, 2002), citotóxico en líneas celulares de cáncer humano (Setter y Setter 2003).

Los triterpenos constituyen un grupo importante de metabolitos secundarios derivados del escualeno. Entre los cuales tenemos a las Argentatinas A y B del tipo cicloartano obtenidas de la resina del *Partenium argentatum*, Gray (guayule) que es un arbusto productor de hule natural a los cuales se les otorga actividad anticancerosa potencial; ya que son capaces de inhibir el crecimiento de varias líneas tumorales, además la Argentatina B es un inhibidor no competitivo de la unión de estradiol a los receptores hormonales –en tumores de mama dependientes de estrógeno. Se obtenido varios derivados, de los cuales se ha estudiado su efecto citotóxico así como su relación estructura actividad, donde se observo que un grupo voluminoso unido a C-2, un doble enlace C-1/C-2 y una baja densidad electrónica cercana a C-25 mejoro la actividad citotóxica en diferentes tipos de líneas celulares cancerígenas. Además se comprobó que el derivado más activo de la Argentatina B fue el 2-formil-

(16 $\beta$ ,24R)-16,24-epoxi-25-hidroxicicloart-1-en-3-ona, el cual fue 35-50 veces más potente que la argentatina B (Parra –Delgado *et al.*, 2006)

Por otro lado, se conoce que la Argentatina B, en el Ensayo de Micronúcleos resulto ser no genotóxica en Linfocitos Humanos (Parra-Delgado H *et al.*, 2005); y mientras que mediante el Ensayo Cometa se observo un efecto genotóxico dosis dependiente, en el mismo sistema biológico (Ramírez, 2008).

Para el presente proyecto se empleó el Ensayo Cometa el cual es un método microscópico, que permite examinar el daño al ADN en células de forma individual (Hernández C, 2000), que se está empleando cada vez con mayor frecuencia en la comprobación de sustancias genotóxicas debido a sus ventajas entre las que podemos mencionar: su sensibilidad a la presencia de niveles bajos de ADN dañado, además se requiere una cantidad pequeña de células por muestra, el poco tiempo para su ejecución y su costo es relativamente bajo, se puede utilizar en varios tejidos y/o tipos de células. (Brendler-Schwaab *et al.*, 2005). En este caso utilizaremos linfocitos humanos debido a que estas células se pueden obtener con técnicas poco invasivas para el ser humano y además son responsables de la respuesta inmune ante cualquier amenaza a la que pueda estar expuesta el organismo, de ahí su uso en las evaluaciones de cito y genotoxicidad (Ostrosky P, 2000).

Al conocer el efecto genotóxico de la Argentatina B, y la relación que existe entre la estructura química y la actividad biológica, el objetivo de nuestro estudio fue la evaluación de la respuesta genotóxica de los derivados de la Argentatina B como son : (16S,17R,20S)-3-oxo-25-nor-cicloartan-16,24 lactona, 2 $\alpha$ - Bromo-(16 $\beta$ , 24R)-16,24-epoxi-25-hidroxicicloartan-3-ona, (16 $\beta$ ,24R)-16,24-epoxi-25-hidroxicicloartan-1en-3-ona, en diferentes dosis, utilizando el ensayo cometa en linfocitos humanos y de esta forma comparar el grado de genotoxicidad de cada uno de ellos.

## **CAPITULO I: MARCO TEÓRICO**

## 1.1. Genotoxicidad.

Se define como Tóxico (dañino) para el ADN. La genotoxicidad es el resultado nocivo de la interacción de agentes químicos o físicos con el aparato hereditario de la célula, y se manifiesta como alteraciones genéticas y/o cambios en el número o estructura de los cromosomas, que pueden incorporarse en generaciones celulares subsecuentes llamadas mutaciones (Clayson, y Grant, 1992).

La determinación genotóxica ya sea en agua, aire, alimentos, contaminantes y compuestos naturales con fines terapéuticos, resultan una herramienta útil para la identificación de riesgos a la salud humana y poder desarrollar medidas de prevención y control ya que las mutaciones que alteran la expresión génica se consideran como un rasgo común de todos los cánceres, aunque muchas de ellas pueden ser ventajosas o neutras y no ocasionar manifestaciones patológicas (Cortinas y Aguirre, 1990). Las alteraciones genómicas asociadas con el cáncer pueden implicar cambios a pequeña escala, como la sustitución de un solo nucleótido, o a gran escala, como reordenaciones cromosómicas, ganancia o pérdida de cromosomas o incluso la interacción de genomas virales en el cromosoma.

Las sustancias genotóxicas que se unen directamente al ADN, se conocen como Genotóxicos Directos, los mismos poseen propiedades intrínsecas necesarias para interactuar con blancos celulares críticos e iniciar procesos genotóxicos. O pueden actuar indirectamente, Genotóxicos Indirectos; mediante la afectación de las enzimas involucradas en la replicación del ADN y causando, en consecuencia, mutaciones que pueden o no desembocar en un cáncer (Mateuca R, *et al.*2006; Arencibia D, Rosario L .2003). Las sustancias genotóxicas no son necesariamente cancerígenas, pero la mayor parte de los cancerígenos son genotóxicos.

Existe un importante grupo de sustancias con capacidad genotóxica (algunas de ellas tras ser metabolizadas), que forman enlaces covalentes con la molécula de ADN, dando lugar a los llamados aductos; los mismos, están considerados como un elemento clave en la iniciación de procesos carcinogénicos, ya que pueden desestabilizar las uniones glucosídicas y dar lugar a sitiosapurínicos con posterior rotura de la cadena de ADN, o pueden causar la inserción de bases incorrectas, que tras el proceso de replicación pueden comprometer la fidelidad de la copia (Weinstein B, 1978; Wogan G, *et al* 1985).

Los daños sobre el ADN, además de por la formación de aductos, pueden producirse por otros procesos diferentes:

- Como son la generación de especies de oxígeno altamente reactivas, (Kuchino Y. et al., 1987).
- Formación de dímeros de pirimidina, desaminación de bases Interfiriendo con los procesos de replicación, metilación o reparación (Shugart L, 2000).
- La hipometilación, consecuencia, por ejemplo, de la oxidación de las bases por radicales libres (Rosiello M et al., 1994; Count J et al., 1995).

Debido a lo antes expuesto, las pruebas genotóxicas en la actualidad son de gran utilidad ya que nos permiten determinar en pequeña o gran escala los daños al ADN así como también, estimar a corto plazo que podría ocurrir cuando un compuesto dado llegue a tener acceso a la célula "*in vivo*" o bien "*in vitro*", dando a conocer así los mecanismos más probables implicados en el proceso mutagénico (Mudry, Carballo 2006).

## 1.2. Carcinogénesis

La capacidad de un agente de producir una neoplasia se denomina carcinogénesis. Es el proceso de transformación progresiva de las células normales en células malignas, se produce la adquisición de autonomía por las mismas, lo que es un reflejo de una regulación y expresión anormal de su carga génica. Como consecuencia final se induce una neoplasia (crecimiento autónomo de un tejido o de una parte de las células del mismo) (Domínguez L, 2004).

Este proceso puede ser resultado de **eventos endógenos** como errores en la replicación del ADN, la inestabilidad intrínseca de ciertas bases del ADN o el ataque de radicales libres generados durante el metabolismo celular. También puede ser resultado de **procesos exógenos** como radiaciones ionizantes, radiaciones ultravioletas (UV) y carcinógenos químicos. Aunque las células tienen mecanismos para reparar las alteraciones producidas, a veces hay errores en dichos mecanismos y los cambios introducidos en el genoma permanecen. Durante esta transformación hay una serie de procesos en los que se alteran los genes implicados en el funcionamiento normal de la célula, responsables de mantener el equilibrio entre la proliferación y la muerte celular (Domínguez L, 2004).

### 1.2.1. Clasificación de los carcinógenos.

Los estudios de toxicidad de cualquier sustancia química incluyen la evaluación del riesgo de carcinogenicidad. La necesidad de este tipo de pruebas descansa tanto en razones científicas como en razones legales y reglamentarias. La lista de sustancias químicas (derivados industriales, plaguicidas, herbicidas, insecticidas, aditivos alimentarios, drogas cosméticas, sustancias originadas en la naturaleza) que por exposición accidental, médica, ocupacional o industrial suponen un riesgo de carcinogénesis es muy numerosa. Por tanto la Agencia Internacional para la Investigación sobre el Cáncer IARC clasifica a los carcinógenos como se muestra en la Tabla 1.

**Tabla 1.** Clasificación de los carcinógenos según la IARC (2010.)

Grupo	Descripción	Referencia a la carcinogenicidad en los animales
1	La sustancia es cancerígena para el hombre.	Esta categoría es usada cuando hay suficiente evidencia de carcinogenicidad en humanos.
2 A	La sustancia es probable cancerígeno para el hombre	Ésta categoría se usa cuando existen pruebas limitadas de carcinogenicidad en humanos y pruebas suficientes en experimentación animal En algunos casos, se pueden incluir sustancias de las que existen pruebas inadecuadas de carcinogenicidad en humanos y pruebas suficientes en animales.
2B	La sustancia es posible cancerígeno para el hombre.	Cuando existen pruebas limitadas de carcinogenicidad en humanos y pruebas insuficientes en experimentación animal Ocasionalmente, si existen pruebas inadecuadas de carcinogenicidad en humanos, pruebas limitadas en animales y otros datos significativos que lo apoyen.
3	Los datos no permiten que la sustancia sea clasificada como cancerígena para el hombre	Cuando existen pruebas inadecuadas de carcinogenicidad en humanos y pruebas inadecuadas o limitadas en experimentación animal.

**Fuente:** International Agency for Research on Cancer, 2010

Por lo antes citado, actualmente muchas investigaciones se llevan a cabo en busca de nuevos **métodos de diagnóstico**, que nos permitan establecer terapias más específicas y que ofrezcan nuevas posibilidades terapéuticas aplicables a la mayoría de los cánceres. Los recientes avances en los estudios de biología molecular han permitido identificar diversos **biomarcadores** que se presentan como importantes herramientas de diagnóstico para la enfermedad.

### **1.3. Biomarcadores**

Se podría definir, en sentido amplio, como la presencia de un xenobiótico en un fluido biológico, y/o las alteraciones inducidas por el mismo sobre los componentes celulares, bioquímicos, sobre procesos, estructuras o funciones en un organismo vivo, que son cuantificables en un sistema biológico o muestra (Hernández G,2012)

Una de las limitaciones más importantes de los biomarcadores radica en que no pueden aplicarse a sustancias que ejercen sus efectos tóxicos de forma instantánea (por ejemplo, gases y vapores irritantes primarios) o sustancias que tienen una tasa de absorción muy pequeña (Hernández G, 2012)

Los biomarcadores deben cumplir los siguientes requisitos:

- Recolección de la muestra y análisis fácil
- Ser específico
- Reflejar únicamente un cambio subclínico y reversible
- Debe permitir adoptar medidas preventivas
- Debe ser éticamente aceptable.

Clasificación de los biomarcadores:

#### **1.3.1. Biomarcadores de exposición:**

Puede ser un compuesto exógeno (o un metabolito) dentro del organismo que refleja la exposición de éste a un xenobiótico. El análisis se realiza en fluidos corporales (sangre y orina, fundamentalmente) o incluso aire espirado. En el caso de tóxicos acumulativos, la dosis interna puede también reflejar la cifra de agente tóxico almacenado en uno o varios compartimentos corporales (Van Cauterén H *et al.*, 1996, Repetto M, 1997).

#### **1.3.2. Biomarcadores de susceptibilidad:**

Sirven como indicadores de sensibilidad individual al efecto de un xenobiótico o grupo de compuestos tóxicos. Se deben generalmente a factores genéticos, reconocibles por

estudios de ADN y sus fragmentos de restricción (RFLPs), clonado de genes e investigación de polimorfismos de actividades enzimáticas (Repetto M, 1997).

### **1.3.3. Biomarcadores de respuesta (o efecto):**

El biomarcador de respuesta o efecto es indicativo de cambios bioquímicos en un organismo como resultado de la exposición a xenobióticos. Incluyen modificaciones en la composición celular sanguínea, alteraciones en actividades enzimáticas, aparición de aductos del ADN, incrementos localizados de ARN-m, aumento de determinadas proteínas, e incluso aparición de anticuerpos específicos (autoanticuerpos) contra un xenobiótico o frente a fracciones celulares (núcleo, membrana, etc) (Repetto M, 1997).

Entre estos, tenemos como ejemplo: Aberraciones Cromosómicas (AC), el Intercambio de Cromátidas Hermanas (ICH), Micronúcleos, Mutaciones Génicas a nivel del locus HPRT, síntesis de ADN no programada y electroforesis de una sola célula (ensayo del cometa), entre otros (Carballo, *et al.*, 2005, Rojas, *et al.*, 2000).

Los biomarcadores constituyen un futuro importante en el campo de la Toxicología por tres razones principales:

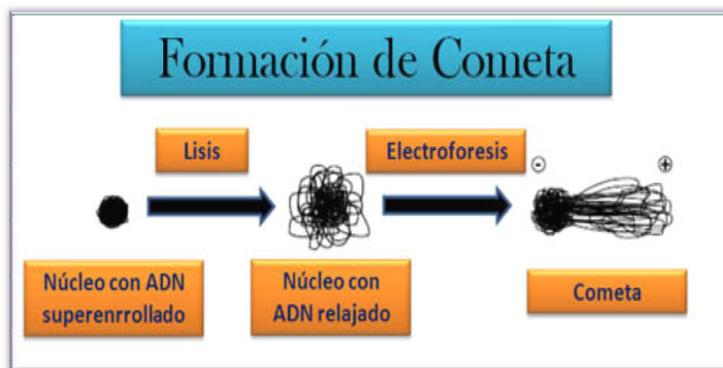
- permiten estimar el efecto biológico sobre un tejido diana;
- sirven de marcadores de alteraciones preclínicas y de indicadores sensibles de patología siendo, por tanto, de gran utilidad en las estrategias diagnósticas y preventivas;
- consideran las variaciones interindividuales en la respuesta a xenobióticos así como la susceptibilidad y mecanismos de acción.

Las circunstancias anteriores han hecho que el uso de marcadores de toxicidad haya aumentado notablemente en la última década, y muy especialmente, en la evaluación de enfermedades progresivas que manifiestan sus síntomas a largo plazo, lo que permite el diagnóstico de la exposición antes de que la enfermedad se manifieste clínicamente y, a veces, de forma irreversible (Ward JB, Henderson RE ,1996).

#### 1.4. Ensayo cometa alcalino

La electroforesis unicelular en gel, llamado comúnmente ensayo cometa, es un método microscópico fluorescente rápido y muy sensible, que permite examinar el daño al ADN en células de forma individual.

El fundamento de este ensayo para detectar daños al ADN producidos por un rompimiento simple o doble en la cadena, daño oxidativo inducido y entrecruzamiento de ADN-ADN/ADN-proteína, se basa en la fragilidad que poseen los sitios dañados; al ser sometidos a un pH superior a trece y su comportamiento en una electroforesis. Los fragmentos de ADN, producto de la acción de la sustancia a probar, afectados por el pH alcalino, migran a una velocidad diferente del resto del material nuclear formando una cabeza (región nuclear) y cola (formada por fragmentos nucleares que han migrado en dirección del ánodo) entre más larga sea esta porción mayor será el daño ocasionado al ADN (Hernández C, 2000).

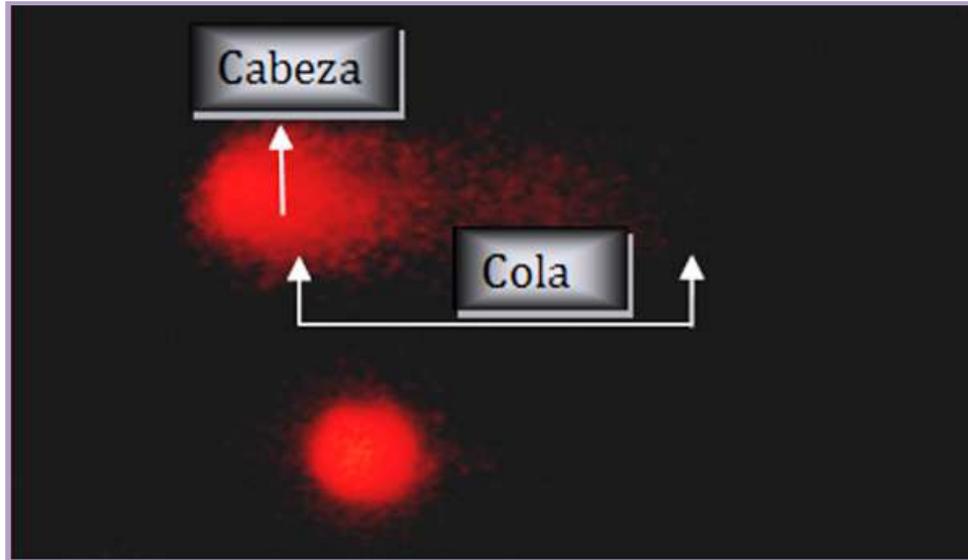


**Figura 1.**Formación de la cola del cometa.

**Fuente:** comet-assay, 2009

El principio básico del ensayo cometa es la migración del ADN fuera del núcleo en una matriz de agarosa bajo condiciones electroforéticas. Dicha migración depende de varios factores como la concentración de agarosa en el gel, el pH, la temperatura, duración del desenrollamiento, voltaje, amperaje y duración de la electroforesis (Hartmann *et al.* 2003; Arencibia *et al.* 2003).

El análisis de los cometas es decir, la migración del ADN puede ser determinada visualmente o medidos por sus características morfológicas obtenidos del análisis de imagen los cuales nos permiten medir varios parámetros entre ellos: longitud, intensidad y momento de cola (Duez *et al.* 2003; Hoffmann *et al.* 2005; Brendler-Schwaab *et al.* 2005).



**Fotografía 1.** Cometa con su cabeza y cola.

**Fuente:** Bautista G, 2010

Algunos factores influyen en el nivel de daño del ADN detectado por el Ensayo Cometa, según estudios anteriores existe intra e inter individualidad entre muestras de sangre obtenidas a partir de donantes humanos. Esto está determinado por la edad, la contaminación del aire, la dieta, el ejercicio, sexo, exposición a la luz solar, el hábito de fumar (Moller. *et al* 2000).

El estado del ciclo celular puede ser un nivel adicional de complejidad, ya que la estructura de la cromatina afecta el rol del ADN durante la formación del cometa y los cambios de la estructura de la cromatina dependen de la fase del ciclo celular (Rojas *et al.* 1999).

#### **1.4.1. Ventajas del ensayo cometa**

- Sensibilidad a la presencia de niveles bajos de ADN dañado,
- Se requiere una cantidad pequeña de células por muestra, células individuales
- El poco tiempo para su ejecución
- Su costo es relativamente bajo,
- Se puede utilizar en varios tejidos y/o tipos de células (Brendler-Schwaab *et al.*, 2005).

#### **1.4.2. Desventajas del ensayo cometa**

A pesar de las grandes ventajas que presenta el ensayo cometa, algunas limitaciones están asociadas con ésta técnica entre ellas:

- La sensibilidad está ligada a una gran variabilidad en las condiciones del ensayo y pueden verse reflejadas en los resultados.
- Dentro de las variables que más afectan a esta técnica se encuentra: la concentración de agarosa y de las disoluciones, el pH, la duración de cada etapa (principalmente de la desnaturalización y de la electroforesis) (Forchhammer *et al.*, 2008), proceso de la obtención de los resultados, el observador, etc.
- Otro factor es que el ensayo no detecta efectos aneugénicos, los cuales pueden ser eventos claves en el desarrollo de un proceso de carcinogénesis (COM, 2000).

#### **1.4.3. Aplicaciones del ensayo cometa**

Como ya se ha mencionado, dentro de las ventajas que el ensayo cometa posee, esta, su aplicación a una amplia gama de tipos celulares. Lo cual ha conducido a que este bioensayo sea ampliamente utilizado:

- En el área de la toxicología ambiental.
- Estudios de genotoxicidad, para evaluar la seguridad de nuevos productos farmacéuticos u otros agentes (Hartmann *et al.*, 2003).
- Aplicaciones Clínicas, para la investigación del daño q se produce en el ADN y las características de reparación en un amplio rango de células tumorales, en respuestas a una variedad de agentes que inducen daño en el ADN. Además el hecho que los resultados del ensayo puedan ser obtenidos en el mismo día de su aplicación, lo convierte en un método útil para la valoración del daño genético en pacientes asociados a un régimen de tratamiento, que puede ser modificado convenientemente (Tice, 1995).
- Estudios de reparación del ADN, roturas del ADN (Frankenber-Schwager, 1989), escisión de bases (Collins y Horvathova, 2001),
- Estudios de biomonitorización ambiental, área de genotoxicología ambiental.
- Estudios de biomonitorización de poblaciones humanas.

### **1.5. La biodiversidad: Una fuente de compuestos activos**

En la antigüedad, durante la aparición de las grandes civilizaciones, la farmacia dependía de su entorno vegetal, si éste era rico en plantas medicinales, la sociedad disponía de medicamentos (Sagrera J, 2005). Hoy en día el 80 % de la población mundial (Ashis K *et al*, 2001), especialmente los países en desarrollo, usan plantas para enfrentar las principales necesidades en la atención médica (Malagón O, 2007). Estas cumplen un rol importante en el cuidado de la salud por sus constituyentes químicos, generalmente sus metabolitos secundarios, los cuales son responsables de los efectos fisiológicos que producen (Martínez, 1991, Sáenz D, 2004).

En realidad las moléculas obtenidas a partir de fuentes naturales como plantas, organismos marinos y microorganismos han desempeñado, un papel preponderante en el descubrimiento de fármacos para el tratamiento de la mayoría de las enfermedades que afectan a la humanidad. Entre estas moléculas bioactivas se han encontrado a partir de plantas, sustancias antitumorales efectivas *in vitro*, como los alcaloides de la vinca, las camptotecinas, epipodofilotoxinas y taxanos (Cragg, 2005). Además existen metabolitos secundarios con una actividad anticancerosa potencial; como ejemplos podemos citar a las cumarinas, los flavonoides y los terpenos. Incluidos en este último grupo, se encuentran los triterpenos (Parra –Delgado *et al.*, 2006).

### **1.6. Los triterpenos**

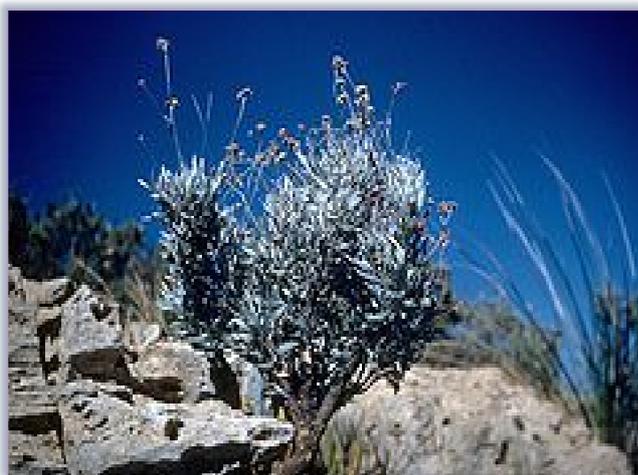
Los terpenos, o terpenoides, constituyen el grupo más numeroso de metabolitos secundarios (más de 40.000 moléculas diferentes). La ruta biosintética de estos compuestos da lugar tanto a metabolitos primarios como secundarios de gran importancia para el crecimiento y supervivencia de las plantas. Suelen ser insolubles en agua y derivan todos ellos de la unión de unidades de isopreno (5 átomos de C). De esta forma, los terpenos se clasifican por el número de unidades de isopreno (C5) que contienen: Los triterpenos tienen 30 C es decir 6 unidades de isopreno (Ávalos A, Pérez E, 2009)

Así se conocen triterpenos antioxidantes (Zhu *et al.*, 1999) antiinflamatorios (Bariceciv *et al.*, 2001); (Marquina *et al.*, 2001); (Oviedo-Chávez *et al.*, 2004), hepatoprotectores, antiproliferativos (Liu *et al.*, 1993; 1995), citotóxico en líneas celulares de cáncer humano (Setter y Setter 2003), antiangiogénicos (Sohn *et al.*, 1993) y proapópticos (Kim Y *et al.*, 2000). Entre los triterpenos con propiedades anticancerosas tenemos por ejemplo, los del

tipo ursano, oleanano, cicloartano, lupano, así como las cucurbitacinas y a las quinonas metilúricas.

### 1.7. Argentatinas A y B

Las Argentatinas A y B son los principales componentes la resina del *Parthenium argentatum*, Gray (guayule) que es un arbusto productor de hule natural, nativo de la República Mexicana. El estudio sistemático de la resina del guayule reveló la presencia de compuestos aromáticos, terpenos y ácidos grasos (Campos,-López et al., 1979, Domínguez X, 1981). Además, se encontró que la resina estaba constituida por una gran cantidad de compuestos triterpénicos de tipo cicloartano, lanostano (Rodríguez-Hanh et al., 1970). Estos compuestos constituían cerca del 55% de los componentes totales de los cuales, el 27% lo representan las argentatinas A, B e incanilina (Schloman et al., 1983).



Fotografía 2. *Parthenium Argentatum*

Fuente: Parra et al. 2005.

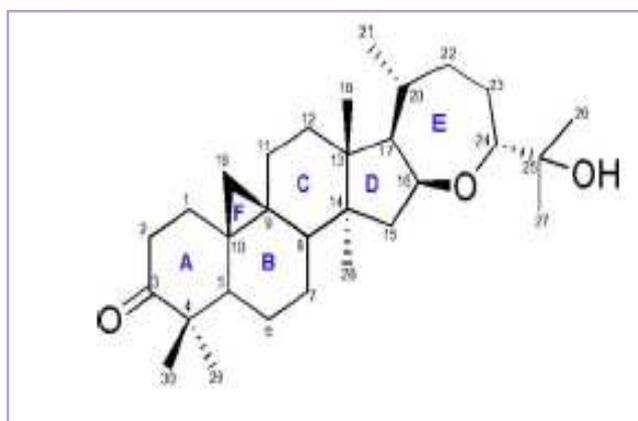


Figura 2. Estructura molecular de la Argentatina B

Fuente: La Autora

Tomando en consideración los antecedentes biológicos de los cicloartanos, así como la naturaleza química se planteó investigar las propiedades biológicas de dichos compuestos, se demostró que la Argentatina A posee actividad antimicrobiana y la Argentatina B es un inhibidor no competitivo de la unión de estradiol a los receptores hormonales –en tumores de mama dependientes de estrógeno Además, se demostró que la Argentatina A y B son capaces de disminuir de manera dependiente de la dosis el edema inducido por el promotor de tumores 13- acetato-12-O-decanoil forbol (TPA) en el modelo de inflamación de la oreja de ratón (Pineda, 1999).

Estos metabolitos secundarios fueron sometidos a diferentes pruebas para conocer su posible efecto genotóxico, en el caso particular de la Argentatina B en el Ensayo de Micronúcleos resulto ser no genotóxica en linfocitos humanos (Parra H. et al, 2005); mientras que mediante el Ensayo Cometa se observo un efecto genotóxico dosis dependiente, en el mismo sistema biológico (Ramírez, 2008).

**1.8. Derivados de la argentatina B: 2 $\alpha$ - Bromo-(16 $\beta$ , 24R)-16,24-epoxi-25-hidroxicicloartan-3-ona, (16 $\beta$ ,24R)-16,24-epoxi-25-hidroxicicloartan-1en-3-ona, (16S,17R,20S)-3-oxo-25-nor-cicloartan-16,24 lactona.**

La actividad citostática y/o citotóxica de algunos núcleos triterpénicos en las líneas celulares de cáncer, se mejora mediante la apertura del anillo A o la incorporación de grupos nitrilo, formilo, carboxilo; así como dobles ligaduras en dicho anillo y; carbonilos  $\alpha\beta$  insaturados en los anillos A y C.

De esta forma a partir de la molécula de Argentatina B se aislaron 14 derivados, y se probó su efecto citotóxico mediante sulforrodamina B; donde se observó que un grupo nitrilo mejoró la actividad citotóxica en diferentes tipos de líneas celulares cancerígenas, así mismo una doble ligadura C1/C2 en éste compuesto produce selectividad por las líneas celulares PC-3 (próstata) y U-251(SNC) .Por otro lado, el derivado más activo de la argentatina B fue el 2-formil-(16 $\beta$ ,24R)-16,24-epoxi-25-hidroxicicloart-1-en-3-ona, el cual fue 35-50 veces más potente que la argentatina B (Parra –Delgado *et al.* 2006).

En la Tabla 2 se muestra la CI<sub>50</sub>± EE( $\mu$ M) de los derivados 2 $\alpha$ - Bromo-(16 $\beta$ , 24R)-16,24-epoxi-25-hidroxicicloartan-3-ona, 16 $\beta$ ,24R)-16,24-epoxi-25-hidroxicicloartan-1en-3-ona y (16S,17R,20S)-3-oxo-25-nor-cicloartan-16,24 lactona, obtenidos por Parra para de ésta

manera conocer su actividad citotóxica, en diferentes líneas celulares de cáncer como C639 (HCT-15), Leucemia (K562) y Próstata (PC-3) y SNC (U251) (Parra *et al.* 2005).

**Tabla 2.** Actividad citotóxica de los derivados de la Argentatina B.

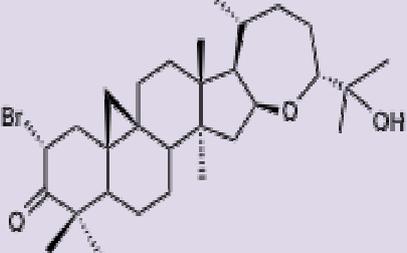
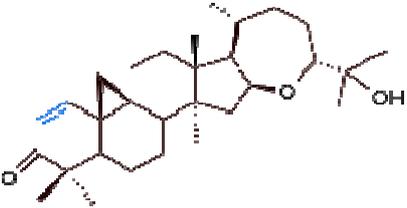
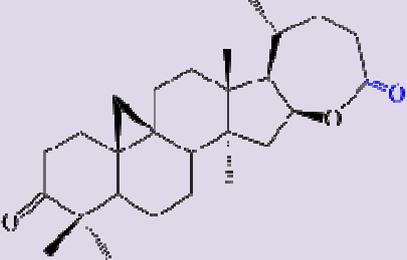
COMPUESTOS	CI <sub>50</sub> ±EE(μM)			
	HCT-15 colon	K562 leucemia	PC-3prostata	U251SNC
Argentatina B	24.14±5.58	79.38±0.08	33.41±3.71	36.4±6.79
2α- Bromo	12.42 ± 0.91	6.03 ± 0.52	18.07 ± 2.27	18.07 ± 2.27
αβ Insaturado	>100	>100	39.35 ± 5.75	19.87 ± 3.72
Lactona	>100	>100	>100	>100
Doxorubicina	0.23 ± 0.01	0.28 ± 0.01	0.32 ± 0.02	0.09 ± 0.02

Fuente: Parra *et al.* 2006

La evaluación farmacológica de tales derivados permitió el establecimiento de algunas relaciones estructura- actividad y, en el caso de los derivados de la argentatina B, también se llevó a cabo un análisis comparativo de campos moleculares (CoMFA).

De esta manera en este proyecto se evaluó la actividad genotóxica de tres derivados de la Argentatina B cuyas estructuras moleculares se muestran en la Tabla 3.

**Tabla 3.** Derivados de la Argentatina B

Nombre Trivial	Nomenclatura IUPAC	Clave	Estructura
2 $\alpha$ -bromo argentatina B	2 $\alpha$ - Bromo-(16 $\beta$ , 24R)-16,24-epoxi-25-hidroxicicloartan-3-ona	$\alpha$ -Br	
$\alpha,\beta$ insaturado Arg B	16 $\beta$ ,24R)-16,24-epoxi-25-hidroxicicloartan-1-en-3-ona	1-en Arg B	
Lactona Arg B	(16S,17R,20S)-3-oxo-25-nor-cicloartan-16,24 lactona	Lactona Arg B	

**Fuente:** Romero JC, 2010

## **CAPITULO II. FIN DEL PROYECTO**

## 2.1. Objetivo general del proyecto

- Determinación del efecto genotóxico de los derivados de la Argentatina B: 2 $\alpha$ -Bromo-(16 $\beta$ , 24R)-16,24-epoxi-25-hidroxicicloartan-3-ona, (16S,17R,20S)-3-oxo-25-nor-cicloartan-16,24 lactona, 16 $\beta$ ,24R)-16,24-epoxi-25-hidroxicicloartan-1en-3-ona mediante ensayo cometa en linfocitos humanos expuestos a 3 horas.

## 2.2. Objetivos específicos del proyecto

- Determinar dosis subtoxicas de los derivados de la Argentatina B mediante la técnica de doble tinción FDA/BrEt.
- Determinar el efecto genotóxico de 2 $\alpha$ - Bromo-(16 $\beta$ , 24R)-16,24-epoxi-25-hidroxicicloartan-3-ona, (16S,17R,20S)-3-oxo-25-nor-cicloartan-16,24 lactona, (16 $\beta$ ,24R)-16,24-epoxi-25-hidroxicicloartan-1en-3-ona mediante la medición del tamaño de cola (migración del DNA).
- Establecer cualitativamente como las modificaciones estructurales realizadas a la molécula de Argentatina B puede variar la respuesta genotóxica inducida en linfocitos humanos expuestos a 3 horas en diferentes dosis.

## **CAPITULO III. METODOLOGÍA**

### **3.1. Modelo biológico**

Se usaron los linfocitos humanos como modelo biológico ya que son las células de mayor elección debido a que éstos pueden ser obtenidas con métodos poco invasivos, para el ser humano y además son responsables de la respuesta inmune ante cualquier amenaza a la que pueda estar expuesta el organismo, de ahí su uso en las evaluaciones de cito y genotoxicidad (Ostrosky P 2000) además tienen una capacidad de proliferación elevada entre otras ventajas (Dusinska M, Collins A. 2008).

### **3.2. Donantes**

Se utilizó sangre periférica heparinizada proveniente de 3 donantes sanos entre 18 y 27 años de edad de sexo masculino, los mismos que cumplieron las siguientes condiciones: no estuvieron bajo ningún régimen medicamentoso, ni cursando por algún cuadro sintomático durante el muestreo.

### **3.3. Compuestos de prueba**

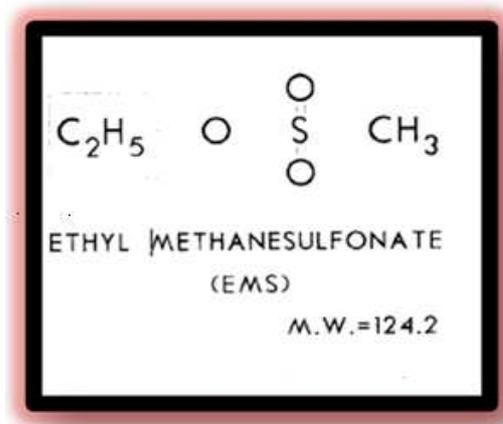
#### **3.3.1. Derivados de la argentatina B.**

Los derivados de la Argentatina B fueron donados por el Ing. Juan Carlos Romero del Instituto de Química Aplicada de la UTPL.

### **3.4. Controles**

#### **3.4.1. Control positivo**

Se utilizó etil metanosulfonato (EMS) (Figura 3) a una concentración de 0,1  $\mu\text{M}$ . Este compuesto pertenece a una clase importante de mutágenos y carcinógenos, además es conocido por ser un agente alquilante (Burns, et al. 1986). La reactividad biológica del EMS es debido a su grupo etilo (Meuth, Arrand. 1982; Sega. 1984).



**Figura 3.** Fórmula estructural del Etil Metano Sulfonato (EMS)  
**Fuente:** Segal, 1984

### 3.4.2. Control negativo

Se utilizó el etanol como disolvente para los compuestos de prueba y como control negativo a una concentración de 0,1 % (v/v).

### 3.5. Ensayo de viabilidad (FDA) y ensayo cometa.

#### Tratamiento:

La siembra se realizó en microtubos de 1,5 mL, para lo que se colocó: 930 µL de medio RPMI (Gibco) suplementado con antibiótico y antimicótico (Gibco), L- glutamina (Gibco) y aminoácidos no esenciales (Gibco) al 1 %; 71,4 µL de sangre heparinizada, luego se dio tratamiento de cada uno de los derivados de la Argentinina B con sus respectivas concentraciones (ver tabla 4), seguidamente se ajustaron todos los derivados a una concentración de 0,1 % de etanol. Finalmente, se dejó incubar por 3 horas a una temperatura de 37°C y humedad atmosférica de 5 % de CO<sub>2</sub>.

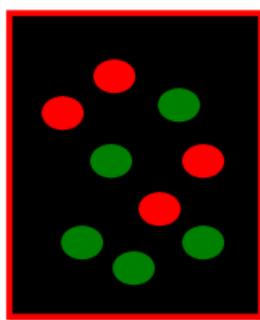
**Tabla 4.** Diseño de Tratamiento para viabilidad y ensayo cometa.

	SUSTANCIAS	CONCENTRACIONES
<b>Control Negativo</b>	Etanol	0.1 %
<b>DERIVADOS DE LA ARGENTATINAB</b>	2 $\alpha$ - Bromo-(16 $\beta$ , 24R)-16,24-epoxi-25-hidroxicicloartan-3-ona	<b>5, 15, 25, 50 <math>\mu</math>M.</b>
	(16S,17R,20S)-3-oxo-25-nor-cicloartan-16,24 lactona	
	2-formil-(16 $\beta$ ,24R)-16,24-epoxi-25-hidroxicicloart-1-en-3-ona	
<b>Control Positivo</b>	EMS	0.1 $\mu$ M

Fuente: Autor

Luego de transcurridas 3 horas de incubación se homogenizaron los tubos con los respectivos tratamientos y controles. Posteriormente se procedió a centrifugar dos veces durante 2 minutos a 10000 rpm. Del pellet que se obtuvo se tomó 20  $\mu$ L y se mezcló con 20 uL de solución FDA-BrEt (FDA 5mg/mL; BrEt 1mg/5mL) con la finalidad de determinar el porcentaje de células viables a través de la técnica de doble tinción con una solución de Diacetato de Fluoresceína – Bromuro de Etidio. De ésta mezcla se tomó 20 uL, se colocó en un portaobjetos y se colocó un cubreobjetos, esto se realizó por duplicado.

Cada placa fue observada en el microscopio de fluorescencia (ZEISS-Axioskop 2 plus) con filtro de 450-490 nm de excitación y 515 nm de emisión; se contaron 200 células por cada placa utilizando el objetivo de 40 X (vivas de color verde y muertas de color rojo) Figura 4.



**Figura 4.** Imagen del ensayo de viabilidad. Células verdes (vivas) y rojas (muertas).

### 3.6. Protocolo del ensayo cometa

Para la realización del ensayo cometa se mezcló 150  $\mu$ L de agarosa de bajo punto de fusión (LMP 1%) con el restante del pellet de células y se procedió a colocar 75  $\mu$ L de esta mezcla en cada laminilla previamente preparadas con agarosa de normal punto de fusión (NMP 1%), esto se lo realizó por duplicado en cada tratamiento; seguidamente, se les colocó el cubreobjetos, se refrigeró durante 5 minutos para fijar la NMP. Luego de la solidificación de la misma se retiró el cubreobjetos y se colocó 130  $\mu$ L de LMP y se dejó refrigerar por 5 min adicionales.

Seguidamente se introdujo las laminillas en un buffer de lisis : 10% de DMSO (Sigma) ;1% de tritón X-100 (Sigma); 2,5 M NaCl (Merck); 100 mM EDTA (Invitrogen), 10 mM Tris (Invitrogen) y pH 10 por un tiempo mínimo de 1 hora y máximo de 15 días.

Previo a la realización de la corrida electroforética se dejó reposar las placas durante 20 minutos en el buffer de electroforesis pH > 13 que contiene: 1 mM EDTA (Invitrogen), 300 mM Hidróxido de sodio (Merck), durante éste paso se tuvo precaución de que el buffer cubra completamente a las placas.

Posteriormente se realizó la corrida electroforética en forma horizontal, las condiciones usadas fueron: 25 V, 300 mA y 20 min (Tice *et al.*, 2000).

Una vez terminada la corrida electroforética, se retiró las laminillas y se rociaron 3 veces con el buffer de neutralización pH 7,5 (0,4 M Tris). Estas se fijaron con metanol helado 2 veces para su posterior análisis.

Para visualizar el daño al ADN producido por las sustancias, las placas se hidrataron y se procedió a teñir con 60  $\mu$ L de bromuro de etidio (1,5mg/mL), para lo cual se utilizó un microscopio de fluorescencia (ZEISS-Axioskop 2 plus) y un ocular micrométrico con el objetivo de 40X. La evaluación se realizó observando 25 cometas por placa, es decir 50 cometas por cada sustancia analizada. El parámetro a evaluar fue la migración del ADN; es decir la longitud de cola del cometa medido en micras ( $\mu$ m) (Hartmann A. et al.2003).

### **3.7. Análisis estadístico.**

#### **3.7.1. Viabilidad FDA**

Para los datos obtenidos de viabilidad se utilizó la prueba de comparación múltiple ANOVA y una prueba post test Dunnett, usando el software estadístico GraphPad Prisma 5.

#### **3.7.2. Ensayo cometa**

El análisis estadístico se lo realizó con el software GraphPad Prisma 5. En cuanto al largo de cola del cometa se usó post test Kruskal – Wallis.

Para realizar la comparación cualitativa de los derivados de la Argentatina B, los derivados se normalizaron con respecto al control de etanol, se estableció las regresiones lineales y se comparó las pendientes con el test ANOVA de dos vías.

## **CAPITULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

Desde la antigüedad una de las principales necesidades del hombre ha sido buscar la cura para las distintas enfermedades que lo han aquejado a lo largo de su historia, una alternativa ha sido el uso de plantas con propósitos medicinales; estas constituyen la fuente primaria para producir diversos fármacos empleados en la terapéutica actual, sobretodo en el tratamiento del cáncer (Cragg, G, *et al.*, 2009).

Los productos naturales poseen actividades biológicas muy altas, por lo que se han utilizado en terapéutica o tomado como modelo para realizar modificaciones estructurales específicas y generar nuevos fármacos (Kingston D *et al.*, 2005). De esta forma, los productos naturales o sus derivados constituyen una buena parte de arsenal terapéutico disponible, además de resultar esenciales en algunos casos para identificar la diana de un fármaco sintético o establecer su implicación en una determinada ruta bioquímica (Harvey A. L. 2008).

De los 1010 nuevos fármacos aprobados por la FDA desde enero de 1981 hasta junio de 2006, 43 eran productos naturales inalterados y 232 (un 23%) eran derivados de productos naturales encuadrados en la denominada segunda generación (Newman, D. *et al.*, 2007). Dentro de estos encontramos al docetaxel (TaxotereR), un análogo de paclitaxel (TaxolR) más potente y más soluble, y a los antibióticos claritromicina (BiaxinR) y azitromicina (ZitromaxR), ambos derivados de eritromicina. Los taxanos actúan estabilizando los microtúbulos y, junto con los inhibidores de la polimerización de tubulina (Kingston D. 2009), se emplean muy frecuentemente en la quimioterapia del cáncer (Avendaño C *et al.*, 2008).

Un gran porcentaje de los principios activos de las plantas están comprendidos dentro de los metabolitos secundarios los cuales son indispensables. Entre los más frecuentes tenemos los terpenos y esteroides, flavonoides, cromenos y benzofuranos, cuamarinas, quinonas, alcaloides entre otras. En el caso de los terpenos son sustancias que se biosintetizan siguiendo la llamada “regla del isopreno” y se clasifican según el número de unidades de isopreno como los triterpenos que tienen 30 átomos de carbono (Ugaz O., 2000)

Los triterpenos pentacíclicos han sido identificados como los principales componentes de las plantas, y han demostrado, entre otros, efectos analgésicos, hepatoprotectores, antitumorales, anti-inflamatorios, antioxidantes y efectores del sistema inmune. De estos compuestos los más estudiados son los ácidos betulínico, ursólico, oleánolico y boswélico (Reyes, F. 2007).

Por lo antes mencionado se ha aislado un triterpeno llamado Argentatina B, componente principal de la resina del *Partenium argentatum*, Gray (guayule); el mismo ha mostrado una gran actividad citostática y citotóxica en varias líneas celulares, por lo cual en busca de compuestos más activos, se ha modificado la estructura química de la Argentatina B dando como resultado la obtención de 14 derivados (Parra., 2006)

Las modificaciones químicas de ésta molécula para la obtención de los 3 derivados analizados en el presente trabajo de investigación fueron, la adición de un átomo de Bromo en el C-2 del anillo A, para obtener el 2 $\alpha$ - Bromo-(16 $\beta$ , 24R)-16,24-epoxi-25-hidroxicicloartan-3-ona, para el derivado (16 $\beta$ ,24R)-16,24-epoxi-25-hidroxicicloartan-1en-3-ona se incorporo una doble ligadura en el mismo anillo, y para el (16S,17R,20S)-3-oxo-25-nor-cicloartan-16,24 lactona se agrego un grupo Lactona en el anillo E.

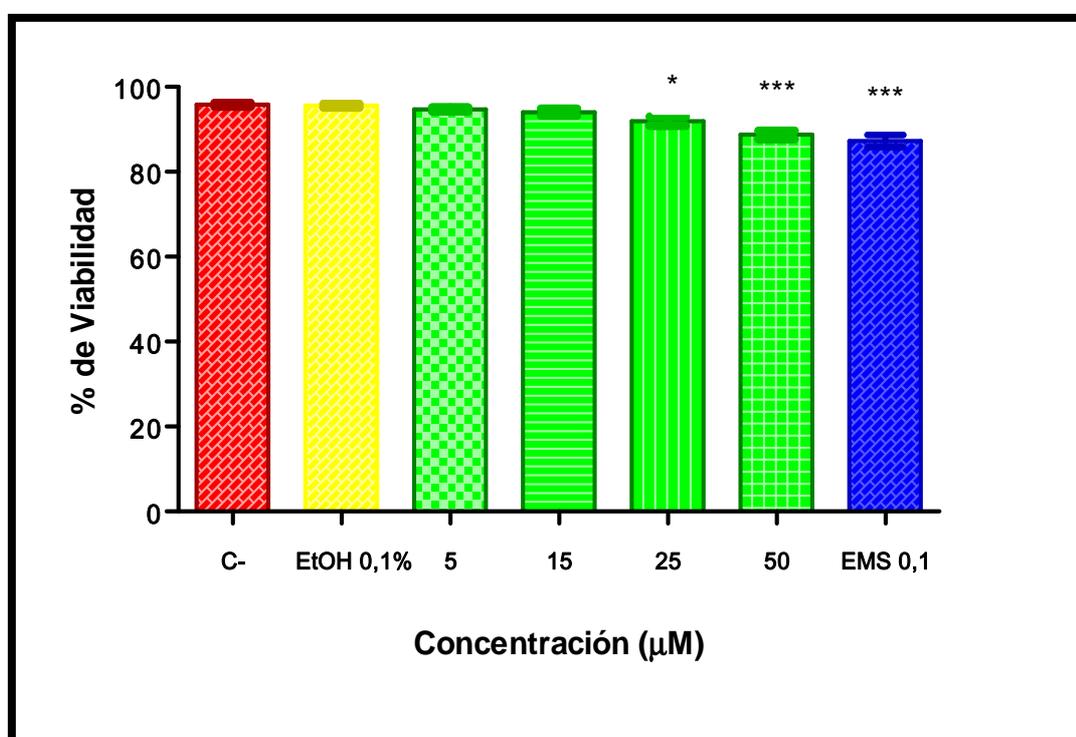
En nuestro caso se realizo el estudio genotóxico de 3 de éstos derivados: 2 $\alpha$ - Bromo-(16 $\beta$ , 24R)-16,24-epoxi-25--hidroxicicloartan-3-ona, (16 $\beta$ ,24R)-16,24-epoxi-25-hidroxicicloartan-1en-3-ona y (16S,17R,20S)-3-oxo-25-nor-cicloartan-16,24 lactona, en linfocitos humanos mediante el ensayo cometa. Éste bioensayo es cada vez más usado debido a que es rápido, económico y muy sensible, puede detectar el daño a nivel de células individuales, como por ejemplo rupturas de simple y doble cadena, la formación de sitios álcali lábiles en el ADN; que han sido parámetros ampliamente utilizados para la detección de genotoxicidad y se han demostrado sus implicaciones en enfermedades degenerativas y el cáncer (Arencibia *et al.*, 2003).

#### **4.1. Viabilidad celular**

Previo a la evaluación genotóxica de los 3 derivados antes mencionados, se realizó el test de viabilidad celular de doble tinción FDA-BrEt., para conocer si es que las concentraciones probadas son subtóxicas, es decir, establecer el porcentaje de células viables para realizar el ensayo.

#### 4.1.1. Viabilidad con 2 $\alpha$ -Bromo-(16 $\beta$ , 24R)-16,24-epoxi-25-hidroxicicloartan-3-ona

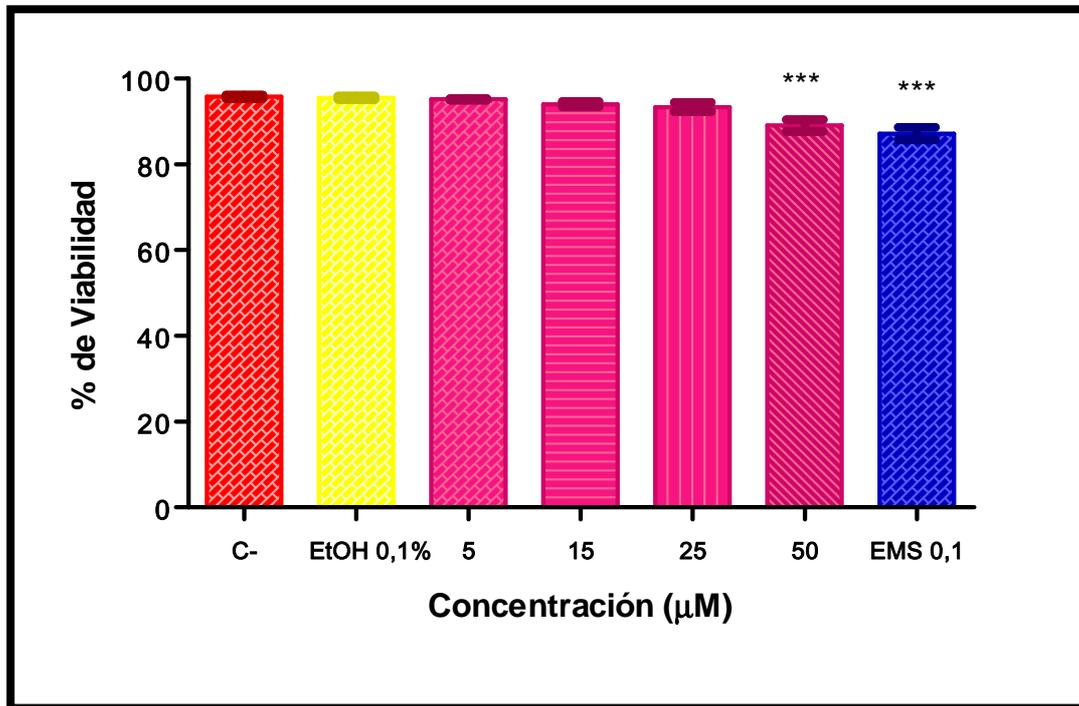
En esta gráfica 1 se puede ver el porcentaje de viabilidad de los linfocitos expuestos por 3 horas a las dosis de 5, 15, 25 y 50  $\mu$ M del derivado 2 $\alpha$ -Bromo-(16 $\beta$ , 24R)-16,24-epoxi-25-hidroxicicloartan-3-ona. Se observa que el porcentaje de viabilidad es mayor del 80% y que existe una diferencia significativa en las dosis de 25 y 50  $\mu$ M con respecto al control negativo de etanol. Además se puede ver que conforme aumenta la concentración del derivado disminuye la viabilidad de los linfocitos.



**Gráfica 1.** Las barras representa la media  $\pm$  SD de tres experimentos independientes de tres donantes diferentes, utilizando el test paramétrico ANOVA y post test de Dunnett (\* $P < 0.05$ , \*\*\* $P < 0.001$ ) con respecto al control negativo con etanol.

#### 4.1.2. Viabilidad con (16 $\beta$ ,24R)-16,24-epoxi-25-hidroxicicloartan-1en-3-ona

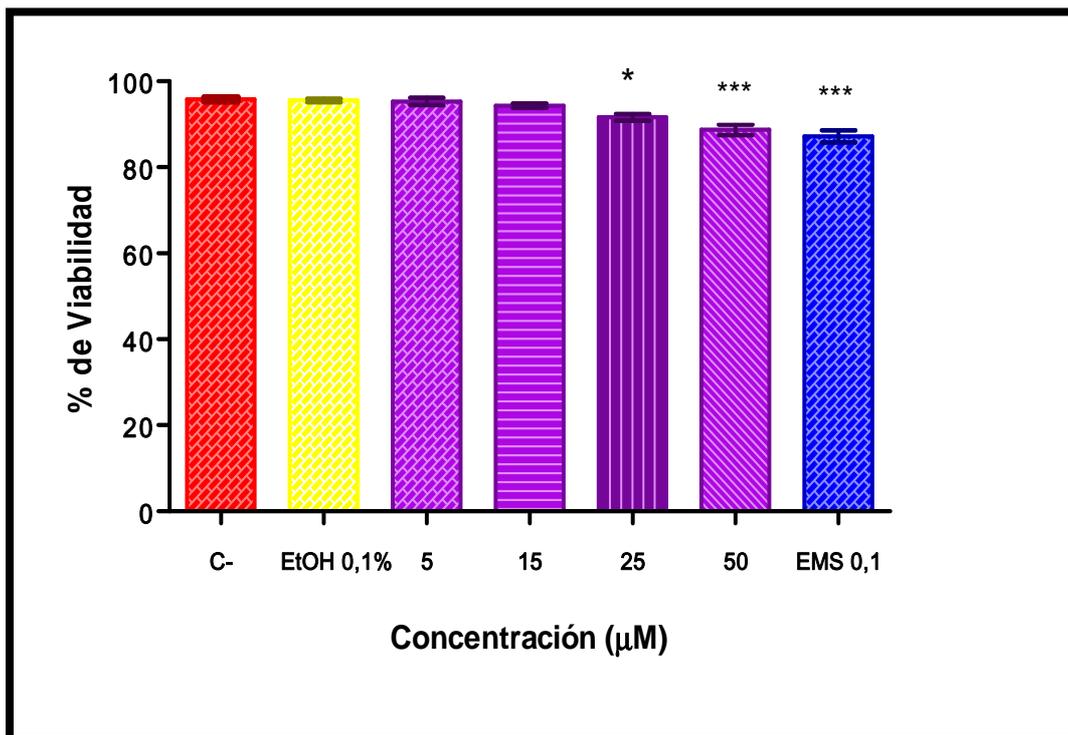
Como se observa en la gráfica 2 la viabilidad del (16 $\beta$ ,24R)-16,24-epoxi-25-hidroxicicloartan-1en-3-ona es mayor al 80% y hay diferencia significativa solo en la concentración de 50  $\mu$ M con respecto al control negativo con etanol.



**Gráfica 2.** Las barras representa la media  $\pm$  SD de tres experimentos independientes de tres donantes diferentes, utilizando el test paramétrico ANOVA y post test de Dunnett (\*\*\*)  $P < 0,0001$ ) con respecto al control negativo con etanol

#### 4.1.3. Viabilidad con (16S, 17R, 20S)-3-oxo-25-nor-cicloartan-16,24 lactona.

En la Gráfica 3 se puede apreciar un efecto dosis dependiente debido a que conforme aumenta la dosis del derivado disminuye la viabilidad de los linfocitos expuestos a 3 horas. El análisis estadístico muestra que hay una diferencia significativa a partir de la dosis de 25  $\mu$ M con respecto al control negativo con etanol.



**Gráfica 3.** Las barras representa la media  $\pm$  SD de tres experimentos independientes de tres donantes diferentes, utilizando el test paramétrico ANOVA y post test de Dunnett (\* $P < 0,05$ , \*\*\*  $P < 0,0001$ ) con respecto al control negativo con etanol.

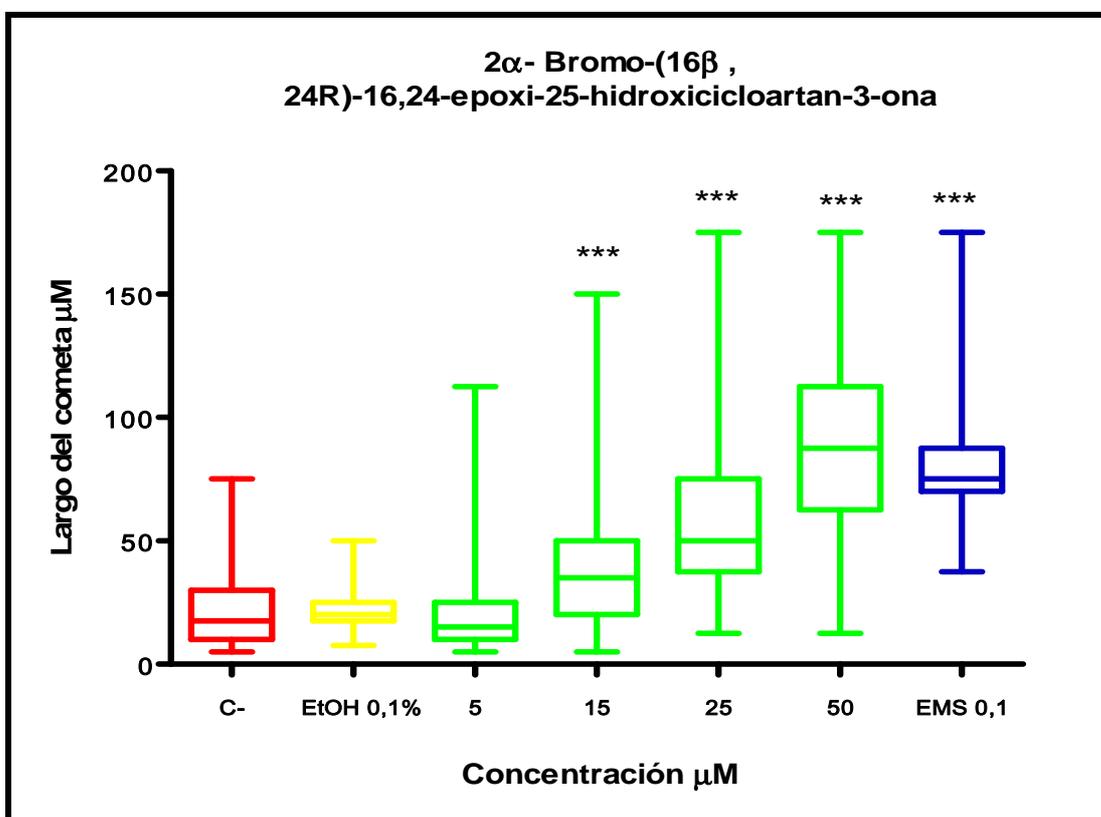
De acuerdo con nuestros resultados, la viabilidad de los linfocitos expuestos a las diferentes dosis es superior al 80%; esto quiere decir se ha trabajado con dosis subtóxicas, además que existe un efecto dosis- dependiente en todos los casos dado que, conforme aumenta la dosis, la viabilidad disminuye, así mismo se comprobó que ningún proceso de muerte puede afectar el proceso genotóxico de los derivados sobre los linfocitos.

El análisis estadístico nos muestra que en las graficas 1 y 3, de los derivados 2 $\alpha$ - Bromo- (16 $\beta$ , 24R)-16,24-epoxi-25-hidroxicicloartan-3-ona y (16S, 17R, 20S)-3-oxo-25-nor-cicloartan-16,24 lactona en las dosis 25 y 50  $\mu$ M existe diferencia significativa con respecto al control negativo con etanol. Mientras que la gráfica 2 que representa la viabilidad del derivado (16 $\beta$ ,24R)-16,24-epoxi-25-hidroxicicloartan-1en-3-ona existe diferencia significativa únicamente en la dosis de 50  $\mu$ M.

## 4.2. Largo de cola con los derivados de la Argentatina B

### 4.2.1. Largo de Cola con 2 $\alpha$ -Bromo-(16 $\beta$ , 24R)-16,24-epoxi-25-hidroxicicloartan-3-ona.

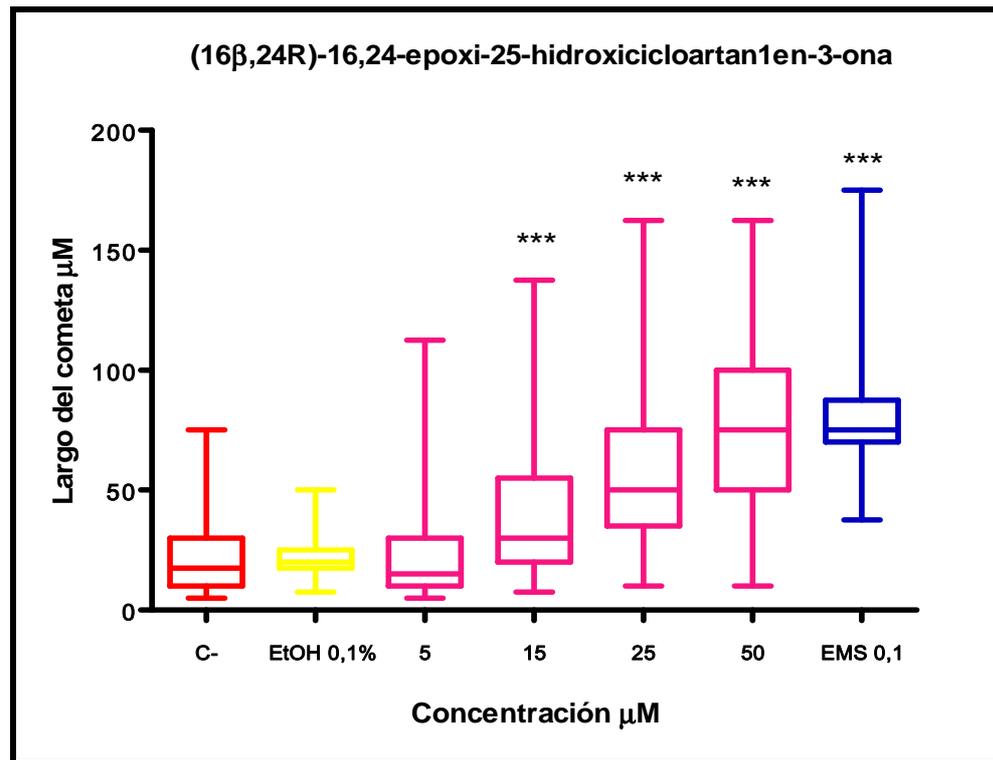
En la gráfica 4 se observa el efecto genotóxico del  $\alpha$  Bromo -(16 $\beta$ , 24R)-16,24-epoxi-25-hidroxicicloartan-3-ona sobre los linfocitos humanos ya que conforme aumenta la dosis también se ve un incremento del tamaño de cola del cometa. El análisis estadístico mediante la Prueba de Kuskal-Wallis demuestra que a dosis de 15, 25 y 50  $\mu$ M existe diferencia significativa con respecto al control negativo con etanol.



**Gráfica 4.** Efecto genotóxico en Linfocitos humanos tratados con diferentes concentraciones del derivado 2 $\alpha$ -Bromo-(16 $\beta$ , 24R)-16,24-epoxi-25-hidroxicicloartan-3-ona. Prueba Kruskal – Wallis (\*\*\*) P < 0.0001).

#### 4.2.2. Largo de cola con (16 $\beta$ ,24R)-16,24-epoxi-25-hidroxicicloartan-1en-3-ona.

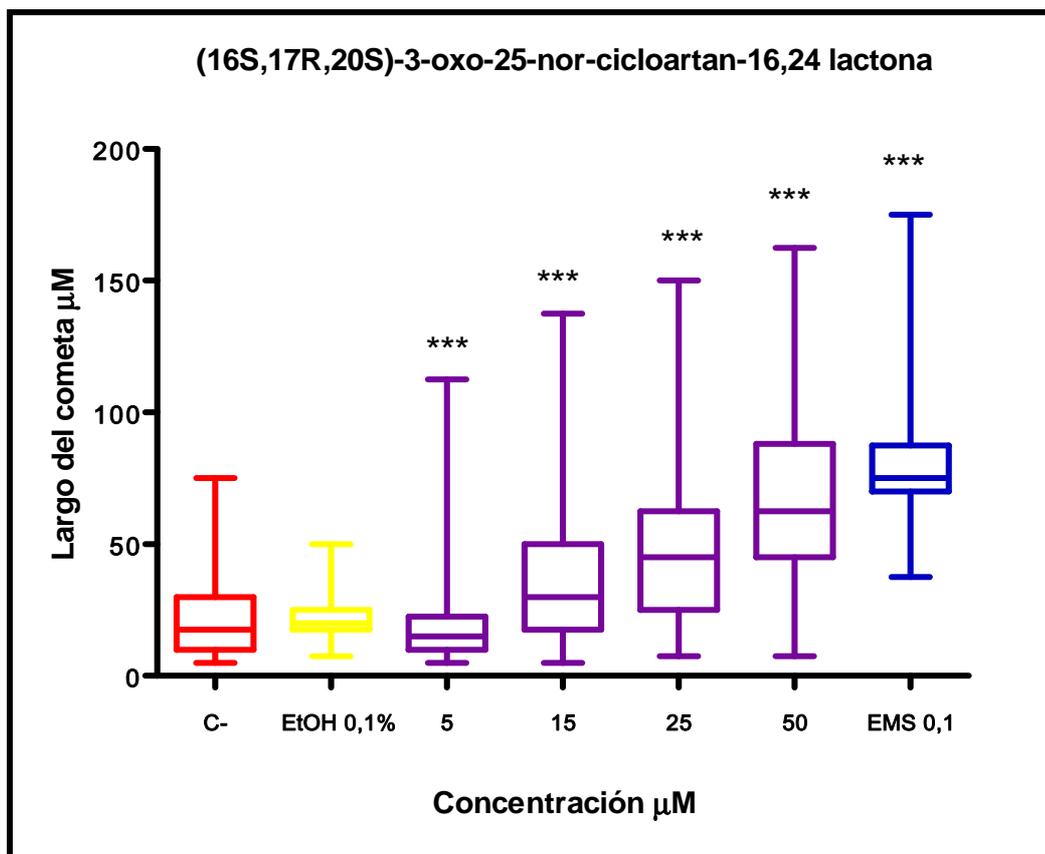
Como se observa en la Gráfica 5 el (16 $\beta$ ,24R)-16,24-epoxi-25-hidroxicicloartan-1en-3-ona induce efecto genotóxico dosis-dependiente y mediante el análisis estadístico se puede ver que existe una diferencia significativa en las dosis de 15, 25, 50  $\mu$ M con respecto al control negativo con etanol.



**Gráfica 5.** Efecto genotóxico en Linfocitos humanos tratados con diferentes concentraciones del derivado (16 $\beta$ ,24R)-16,24-epoxi-25-hidroxicicloartan-1en-3-ona. Prueba Kruskal – Wallis (\*\*\*) P < 0.0001).

#### 4.2.3. Largo de cola con (16S,17R,20S)-3-oxo-25-nor-cicloartan-16,24 lactona.

El daño al ADN producido por el (16S,17R,20S)-3-oxo-25-nor-cicloartan-16,24 lactona se observa en la Gráfica 6 donde hay un incremento del efecto genotóxico conforme aumenta la concentración del derivado. Además de acuerdo con el análisis estadístico demuestra una diferencia significativa en las dosis de 5, 15, 25, 50  $\mu$ M en comparación con el control negativo con etanol.

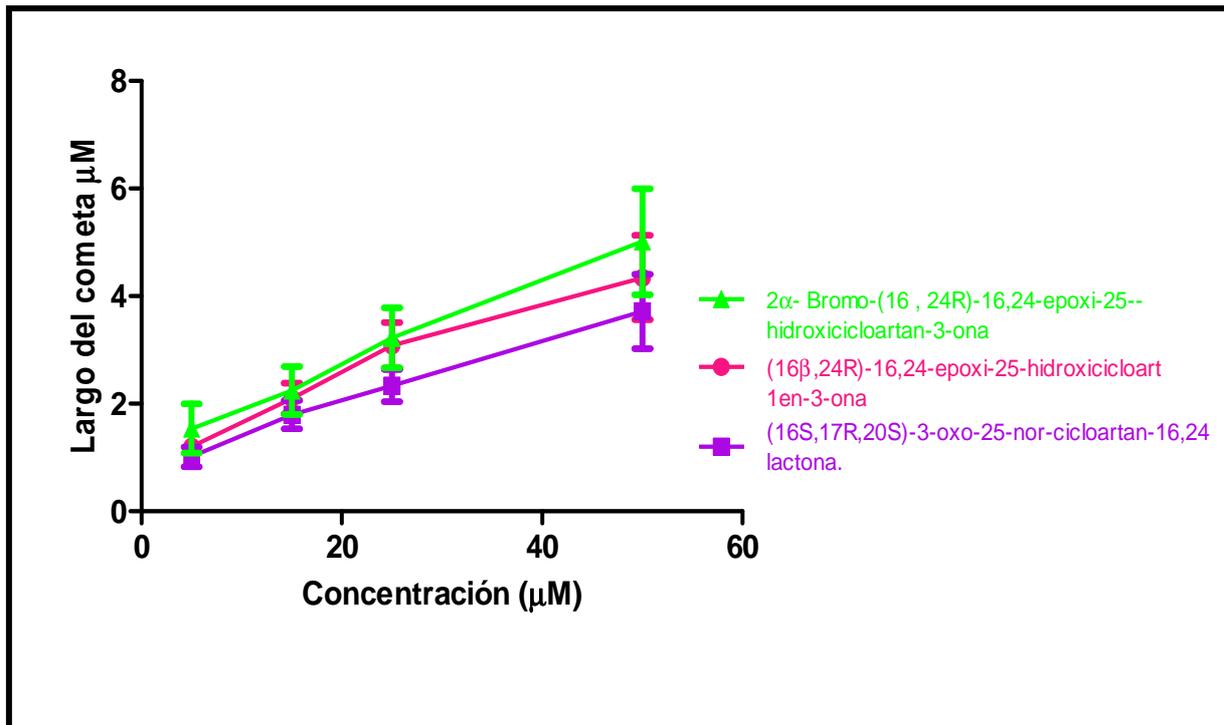


**Gráfica 6.** Efecto genotóxico en Linfocitos humanos tratados con diferentes concentraciones del derivado (16S, 17R, 20S)-3-oxo-25-nor-cicloartan-16,24 lactona. Prueba Kruskal – Wallis (\*\*\*) P < 0.0001).

**4.3. Comparación cualitativa de los derivados de Argentatina B: 2α- Bromo-(16β, 24R)-16,24-epoxi-25-hidroxicicloartan-3-ona, (16β,24R)-16,24-epoxi-25-hidroxicicloartan-1en-3-ona y (16S, 17R, 20S)-3-oxo-25-nor-cicloartan-16,24 lactona.**

En la gráfica 7 se muestra la comparación de los tres derivados estudiados, donde el 2α- Bromo-(16β, 24R)-16,24-epoxi-25-hidroxicicloartan-3-ona es el más genotóxico. Además de acuerdo con nuestros resultados todos tuvieron un efecto genotóxico con diferencias entre ellos, siendo de mayor a menor:

2α- Bromo-(16β, 24R)-16,24-epoxi-25-hidroxicicloartan-3-ona > (16β,24R)-16,24-epoxi-25-hidroxicicloartan-1en-3-ona > (16S,17R,20S)-3-oxo-25-nor-cicloartan-16,24 lactona



**Gráfica 7.** Representación de pendientes de los derivados de argentatina B. ANOVA de dos vías. 2α- Bromo-(16β, 24R)-16,24-epoxi-25-hidroxicloartan-3-ona, (16β,24R)-16,24-epoxi-25-hidroxicloartan-1en-3-ona y (16S, 17R, 20S)-3-oxo-25-nor-cicloartan-16,24 lactona.

Comparando éstos resultados con los obtenidos en anteriores estudios, en los cuales la Argentatina B, mostro efectos genotóxicos sobre linfocitos humanos (Ramírez M, 2008), y además 4 de sus derivados también obtuvieron el mismo resultado, observando que el 2-formil y 2α-ciano presentaron mayor daño genotóxico, mientras que los derivados 25-O-Acetil y 3-oxima no presentaron un efecto considerable (Bautista. 2010). Podemos decir que los nuestros siguen la misma línea, ya que en todos los derivados mostraron efecto genotóxico sobre los linfocitos humanos, siendo el 2α- Bromo-(16β, 24R)-16,24-epoxi-25-hidroxicloartan-3-ona el que presento mayor genotoxicidad ; esto podría deberse a la incorporación de un átomo de bromo en el C2 el cual incremento su actividad, ya que tomando en cuenta la estructura básica de los triterpenos de sus efectos eléctricos y estéricos, utilizando la metodología del análisis comparativo de los campos moleculares (CoMFA), permitieron deducir que esta actividad se ve incrementada por residuos polarizables en el átomo de C-2, es decir que existe una región estéricamente favorable, lo que indica que la presencia de sustituyentes en ésta posición favorece la actividad biológica (Parra *et al.* 2006).

Poco se conoce el mecanismo de acción por el cual los derivados 2 $\alpha$ - Bromo-(16 $\beta$ , 24R)-16,24-epoxi-25-hidroxicicloartan-3-ona, (16 $\beta$ ,24R)-16,24-epoxi-25-hidroxicicloartan-1en-3-ona y 16S,17R,20S)-3-oxo-25-nor-cicloartan-16,24 lactona causan daño al ADN, sin embargo podemos suponer que es el mismo efecto que el de la Argentatina B, ya que teniendo como modelo biológico los linfocitos humanos; pudo inducir daño indirecto al ADN, posiblemente causado por estrés oxidativo debido a la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Hail et al., 2004).

Hoy en día los triterpenos son estudiados por sus efectos hepatoprotectores, antiinflamatorios, analgésicos, antimicrobianos, inmunomoduladores, antimicóticos, virostáticos y tónicos. Actualmente, son utilizados en la prevención y tratamiento de la hepatitis, infecciones parásitas y de protozoos y sobre todo por sus efectos citostáticos. La principal desventaja en el uso de los triterpenos es de hecho la toxicidad asociada con sus propiedades hemolíticas y citostáticas. Por lo que junto con su obtención y aislamiento, se están desarrollando derivados sintéticos con menor toxicidad y mayor potencial terapéutico.

Los triterpenos pentacíclicos han presentado multitud de propiedades bioactivas y/o biofuncionales altamente provechosas, con unos índices de eficacia muy elevados. Entre estas propiedades unas de las más importantes y prioritarias para el desarrollo humano actual son sus cualidades como anticancerígenos, antitumorales, efectos de diferenciación sobre células malignas y de protección frente al cáncer (Reyes F. 2007).

De ahí la importancia del presente estudio, ya que éste ha tenido como objetivo la búsqueda de compuestos menos tóxicos, este es el caso de la Argentatina B y sus derivados los cuales forman parte de los triterpenos pentacíclicos los cuales tienen gran importancia por sus propiedades altamente terapéuticas.

## **CAPITULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES**

## CONCLUSIONES

- Podemos concluir que las dosis utilizadas de los tres derivados (5,15, 25 y 50  $\mu\text{M}$ ) son subtóxicas debido a que la supervivencia celular fue mayor al 80%.
- Los derivados de la Argentatina B producen daño genotóxico, debido a que según los resultados se ve la formación de la cola del cometa, es decir los fragmentos del ADN dañado en todos los ensayos con los diferentes derivados.
- Los derivados de la Argentatina B muestran distinto efecto genotóxico sobre los linfocitos humanos, siendo el 2 $\alpha$ - Bromo-(16 $\beta$ , 24R)-16,24-epoxi-25-hidroxicicloartan-3-ona el más genotóxico.
- Concluimos que la estructura química es un factor que determina la actividad biológica de un compuesto.

## RECOMENDACIONES

Es necesario seguir en la búsqueda de moléculas con características citotóxicas potenciales pero que no causen ningún daño al ADN, este es el caso del presente trabajo de investigación en el cual se mostró que los derivados de la Argentatina B producen un efecto genotóxico sobre el ADN, el siguiente paso sería ampliar la batería de test que nos ayude a elucidar como el cambio estructural de la molécula influye sobre el material genético.

## BIBLIOGRAFÍA

- Arencibia D, Rosario L. (2003). Actualización sobre el ensayo cometa y de micronúcleos *in vitro*. Revista de toxicología en línea 24-41.
- Ashis K. Mukherjee, Sourav Vasu, Nabanita Sarkar, Anil C. Ghosh. (2001). Advances in cancer therapy with plant based natural products. Current Medicinal Chemistry 8, 1467 – 1486.
- Ávalos A, Pérez E, 2009. Metabolismo secundario de plantas. Reduca (Biología). Serie Fisiología Vegetal. 2 (3): 119-145.
- Avendaño, C. & Menéndez, J. C. (2008) Medicinal Chemistry of Anticancer Drugs. Ed. Elsevier B. V. Cap. 8, pág. 229-249.
- Bautista G. (2010). Evaluación del efecto genotóxico mediante el Ensayo Cometa en linfocitos humanos de los derivados de la Argentatina B ((16 $\beta$ , 24R)-16,24-epoxi-25-hidroxicicloartan-3-ona): 3-oxima, 25-O-acetil, 2 $\alpha$ -ciano, y 2-formil. Tesis de grado previa a la obtención del título de Bioquímica Farmacéutica. Universidad Técnica Particular de Loja. Loja- Ecuador.
- Brendler-Schwaab S, Hartmann A, Pfuhler S, Speit G. (2005). The *in vivo* comet assay: use and status in genotoxicity testing. Mutagenesis 20, 245-254.
- Burns P, Allen F, Glickman B. (1986). DNA sequence analysis of Mutagenicity and site specificity of ethyl methanesulfonate in Uvr+ and UvrB- strains of *Escherichia coli*. Genetics Society of America. 113, 811-819.
- Campos-López E., Navaes-Camacho E., Ponce-Vélez M.A., Angulo-Sánchez J.L. (1979). Chemtech 9: 50.
- Collins A, Azqueta A, Brunborg G, Gaivao I, Giovannelli L, Kruszewski M, Smith C, Stetina R. (2008). The comet assay: topical issues. Mutagenesis 23, 143-151.
- COM (Committee on Mutagenicity of Chemical in Food, Consumer Products and the Environment). (2000). Guidelines on a strategy for testing of chemicals for mutagenicity. <http://www.doh.gov.uk/com.htm>.
- Counts, J. L. and Goodman, J. I. (1995). Hypomethylation of DNA: a possible epigenetic mechanism involved in tumor promotion. Prog. Clin Biol. Res. 391, 81-10
- Clayson D y Grant D. (1992). The assessment of mutagenicity. Health protection branch mutagenicity guidelines. Environmental and Molecular Mutagenesis: Vol. 21:15-37.
- Collins, A. R., E. Horvathova. (2001). Oxidative DNA damage, antioxidants and Dna repair: applications of the comet assay. Biochem Soc Trans, 29: 337-341.

- Cortinas, N.C. y Aguirre, E.J. (1990). Cáncer y ambiente, bases epidemiológicas para su investigación y control. Modulo Carcinogénesis. Centro Panamericano de Ecología Humana y Salud, Programa de Salud Ambiental, Organización Panamericana de la Salud, Organización Mundial de La Salud. México. 33-43.
- Cragg G, Newman D. Plants as a source of anti-cancer agents. *Journals of Ethnopharmacologia* 100 (2005) 72-79.
- Domínguez L. (2004). Principios Básicos de Carcinogénesis: Carcinogénesis Química Y Hormonal. Departamento de Ciencias Clínicas. Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Instituto Canario de Investigación del Cáncer.
- Domínguez X.A. Cap. 7: Aspectos químicos del guayule. En 1981. Guayule, reencuentro en el desierto. Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología. Centro de Investigación en Química Aplicada. Comisión Nacional de las Zonas Áridas. México. Pp 27-70.
- Duez P, Dehon G, Kumps A, Dubois J. 2003. Statistics of the Comet assay: a key to discriminate between genotoxic effects. *Mutagenesis* 18, 159-166.
- Dusinska M, Collins. (2008). The comet assay in human biomonitoring: gene-environment interactions. *Mutagenesis* 23. 191-205.
- Forchhammer, L., E.V. Brauner, J.K. Folkmann, P. H. Danielsen, C. Nielsen, A. Jensen, S. Lott, G. Friis, P. Moller. (2008). Variation in assessment at oxidatively damaged DNA in mononuclear blood cells but the comet assay with visual Scoring. *Mutagenesis*, 23:223-231.
- Frankenberg-Schwager, M. (1989). Review of repair kinetics for DNA damage induced in eukaryote cells in vitro by ionizing radiation. *Radiother Oncol*, 14: 307-320.
- Hail N, Konopleva M, Sporn M, Lotan R, and Andreeff M. (2004). Evidence Supporting a Role for Calcium in Apoptosis Induction by the Synthetic Triterpenoid 2 – Cyano - 3 ,12 – dioxooleanoma – 1,9 – dien – 28 oic Acid (CDDO), . *Biol. Chem.*, Vol. 279, Issue 12, 11179-11187.
- Hartmann A, Agurell E, Beevers C, Brendler- Schwaab S, Burlinson B, Clay P, Collins A, Smith A, Speit G, Tice R. (2003). Recommendations for conducting the *in vivo* alkaline Comet assay. *Mutagenesis* 18, 45-51.
- Harvey, A. L. (2008) Natural products in drug discovery. *Drug Discov. Today* 13: 894-901.
- Hernández C, Díaz A, Cadena E, Moreno E, Ruiz L, Diaz S, Madrigal E. Electroforesis (2000). Unicelular (Ensayo Cometa) como indicador de antigenotoxicidad inducida por *Amphipterygium Adstringens*. 2ª Congreso Nacional de Química Médica.

- Hernández G. (2012). El papel de los biomarcadores en Toxicología Humana. Departamento de Medicina Legal y Toxicología. Facultad de Medicina de la Universidad de Granada.
- Hoffmann H, Hogel J, Speit G. (2005). The effect of smoking on ADN effects en the comet assay: a meta- analysis. *Mutagenesis* 20, 455- 466.
- International Agency for Research on Cancer, 2010.
- Kingston, D. G. & Newman, D. J. (2005) Natural products as drug leads: An old process or the new hope for drug discovery? *Idrugs*. 8: 990-992.
- Kingston, D. G. I. (2009) Tubulin-Interactive Natural Products as Anticancer Agents. *J. Nat. Prod.* 72: 507-515.
- Kim Y.K., Yoon S.K., Ryu S.Y. (2000). Cytotoxic triterpenes from stem bark of *Physocarpus intermedius*. *Planta Medica* 66: 485-486.
- Kuchino, Y., Mori, F., Kasai, H. Inoue, H., Iwai, S., Miura, K., Ohtsaka, F., and Nishimura S. (1987) Misreading of DNA templates containing 8-hydroxydeoxyguanosine at the modified base and a adjacent residues. *Nature*, 327, 77-79.
- 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.
- Mateuca R, Lombaert N, Alka P, Decordier I, Volders K. (2006). Chromosomal changes: induction, detection, detection methods and applicability in human biomonitoring. *Biochimie* 245, 415-422.
- Marquina S., Maldonado N., Garduno-Ramírez M.L., Aranda E., Villarreal M.L., Navarro V., Bye R., Delgado G., Alvarez L. (2001). Bioactive oleanolic acid saponins and other constituents from roots of *Siguiera decurrens*. *Phytochemistry* 56: 93-97.
- Martínez, M. (1991). Catálogo de nombres vulgares y científicos de plantas mexicanas. Fondo de la cultura Económica. México. Meuth M, Arrend, 1982. Alterations of Gene Structure in Ethyl Methane Sulfonate- Induced Mutants of Mammalian Cells. *Molecular and Cellular Biology* 2, 1459-1462.
- Moller P, Knudsen L, Loft S, Wallin H. (2000). The comet assay as a rapid test in Biomonitoring Occupational Exposure to ADN-damaging agents and effect of confounding factors. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention* 9, 1005-1015.
- Montero A, Vega Y, Piloto J, Rodríguez J. (2008). Genotoxicidad de *Justicia pectoralis* Jacq. (tilo). *REVISTA CUBANA DE PLANTAS MEDICINALES*; 13(2).
- Mudry M, Carballo M. (2006). *Genética Toxicológica*. Editorial De los cuatro vientos. Argentina.

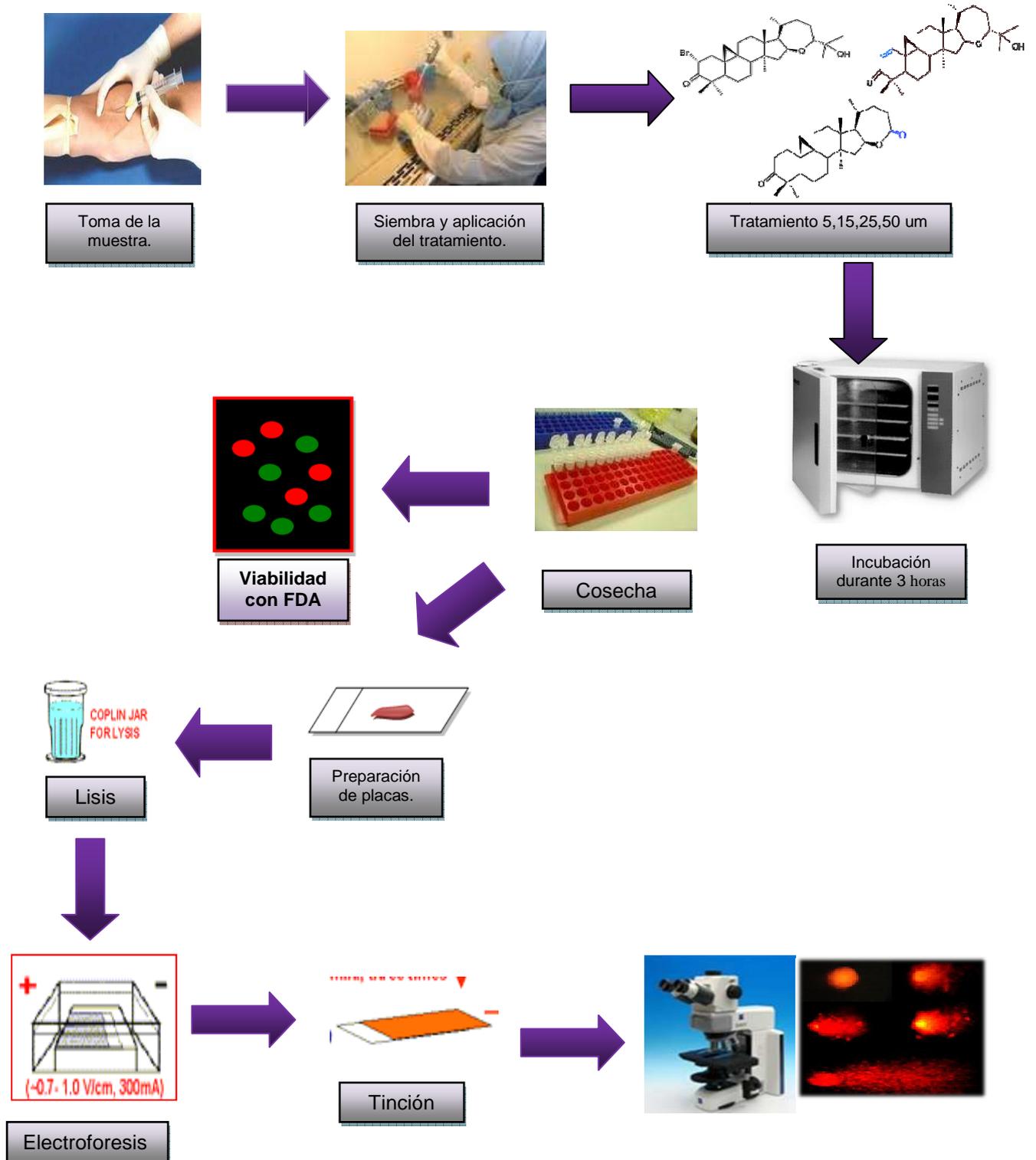
- Navarro M. (2005). Los productos naturales en la innovación farmacológica. Departamento de Farmacología. Facultad de Farmacia, Universidad de Granada.
- Newman, D. J. & Cragg, G. M. (2007). Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. *J. Nat. Prod.* 70: 461-477
- Ostrosky P, Gonsebatt M. (2000). El Tejido Linfocitario en la Evaluación de biomarcadores de efecto. Instituto de Investigaciones Biomédicas UNAM. A.P.70228, Ciudad Universitaria, México 04510, D.F.
- Oviedo-Chávez I., Ramírez-Apan T., Soto-Hernández M., Martínez-Vázquez M. (2004). Principles of the bark of *Amphipterygium adstringens* (Julianaceae) with anti-inflammatory activity. *Phytomedicine* 11: 436-445.
- Parra H, Ramírez T, Martínez M. (2005). Synthesis of argentatin A derivatives as growth inhibitors of human cancer cell lines *in vitro*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 15, 1005-1008.
- Parra H, Compadre C, Ramírez T, Muñoz M, Compadre L, Ostrosky P, Martínez M. (2006). Synthesis and comparative molecular field analysis (CoMFA) of argentatin B derivatives as growth inhibitors of human cancer cell lines. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 14, 1889-1901.
- Park, J., Shigenaga, M. And Ames B. (1996) Induction of cytochrome P4501A1 by 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin or indolo (3,2-b)carbazole is associated with oxidative DNA damage. *Proc Natl Acad Sci USA.* 93, 2322-2327.
- Paz y Miño C, Creus A, Cabre O, Leone P. (2002). *Genética Toxicológica y Carcinogenesis*, PUCE, Quito - Ecuador.
- Pérez M, Dubner D, Michelin S, Gisone P, Carosella E. (2002). Telomeros y reparación de daño genómico su implicancia en patología humana.
- Peto J. 2001. Progress Cancer epidemiology in the last century and the next decade
- Pineda M. (1999). Tesis de Maestría. Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Químicas, Universidad Nacional Autónoma de México.
- Ramírez M. (2008). Estudio genotóxico de Argentatina B mediante ensayo cometa en linfocitos humanos. Tesis de grado previa a la obtención del título de Bioquímica Farmacéutica. Universidad Técnica Particular de Loja. Loja- Ecuador.
- Repetto M (1997). Diagnóstico de la intoxicación. En: Repetto M (ed). *Toxicología Fundamental*. Díaz de Santos, Madrid, pp. 327-333.
- Reyes F. (2007). Caracterización del efecto anticancerígeno del ácido maslínico, triterpeno pentacíclico de origen natural. Tesis Doctoral. Universidad de Granada.

- Rodriguez-Hahn L., Romo de Vivar A., Ortega A., Aguilar M., Romo J. (1970). Determinación de las estructuras de las argentatinas A, B y C del guayule. *Revista Latinoamericana de Química* 1: 24-38.
- Rojas E, Lopez M, Valverde M (1999). Single cell gel electrophoresis assay: methodology and applications. *Journal of Chromatography B* 722, 225-254.
- Rossiello, M., Rao, P., Rajalakshami, S. and Sarma D.S (1994). Similar patterns of hypomethylation in the  $\beta$ -hydroxy- $\beta$ -methylglutaryl coenzyme A reductase gene in hepatic nodules induces by different carcinogens. *Mol. Carcinogen.* 10, 237-245.
- Sáenz D. (2004). Escuela de medicina. Estudio de utilización de medicamentos.
- Sagrera J. (2006). Historia de la Farmacia. Barcelona.
- Schloman W.W., Hively R.A., Krishen A., Andrew M. A. (1983). Guayule byproduct evaluation: extract characterization. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 31: 873-876.
- Sega G. (1984). A review of the genetic effects of ethyl methanesulfonate. *Mutation Research* 134, 113-142.
- Setzer W.N. y Setzer M.C. (2003). Plant-Derived Triterpenoids as Potential Antineoplastic agents. *Mini-Review in Medicinal Chemistry* 3: 540-556.
- Sohn K.L., Lee H.Y., Chung H.Y., Young H.S., Kim K.W. (1993). Anti-angiogenic activity of triterpene acids. *Cancer Letters* 94: 213-218.
- Shugart L.R. (2000) DNA damage as a biomarker of exposure. *Ecotoxicology*, 9, 329-340.
- Sugg, D.W., Bickham, J.W., Brooks, J.A., Lomakin, M.D., Jagoe, C.H., Dallas, C.E., Smith, M.H., Baker, R.J. and Chesser, R.K. (1996) DNA damage and radiocesium in channel catfish from Chernobyl. *Env. Tox. and Chem.* 15,1057–1063.
- Tice R, Vásquez M. (2000). Protocol for The Application of the pH >13 Alkaline Single Cell Gel (SCG) Assay to the detection of DNA damage in mammalian cells. *Cell Res.* 175, 184-191.
- Ugaz O. Manual de Fitoquímica. Análisis Fitoquímico y Metabolitos Secundarios. Pontificia Universidad Católica del Perú.
- Van Cauteren H, de Kok MCM, Van Schooten FJ (1996). Cancer risk evaluation. In: Niesink RJM, de Vries J, Hollinger MA (eds). *Toxicology. Principles and applications.* CRC, New York, pp. 384-413.
- Ward JBJr, Henderson RE (1996). Identification of needs in biomarker research. *Environ Health Perspect* 104: 895-900.

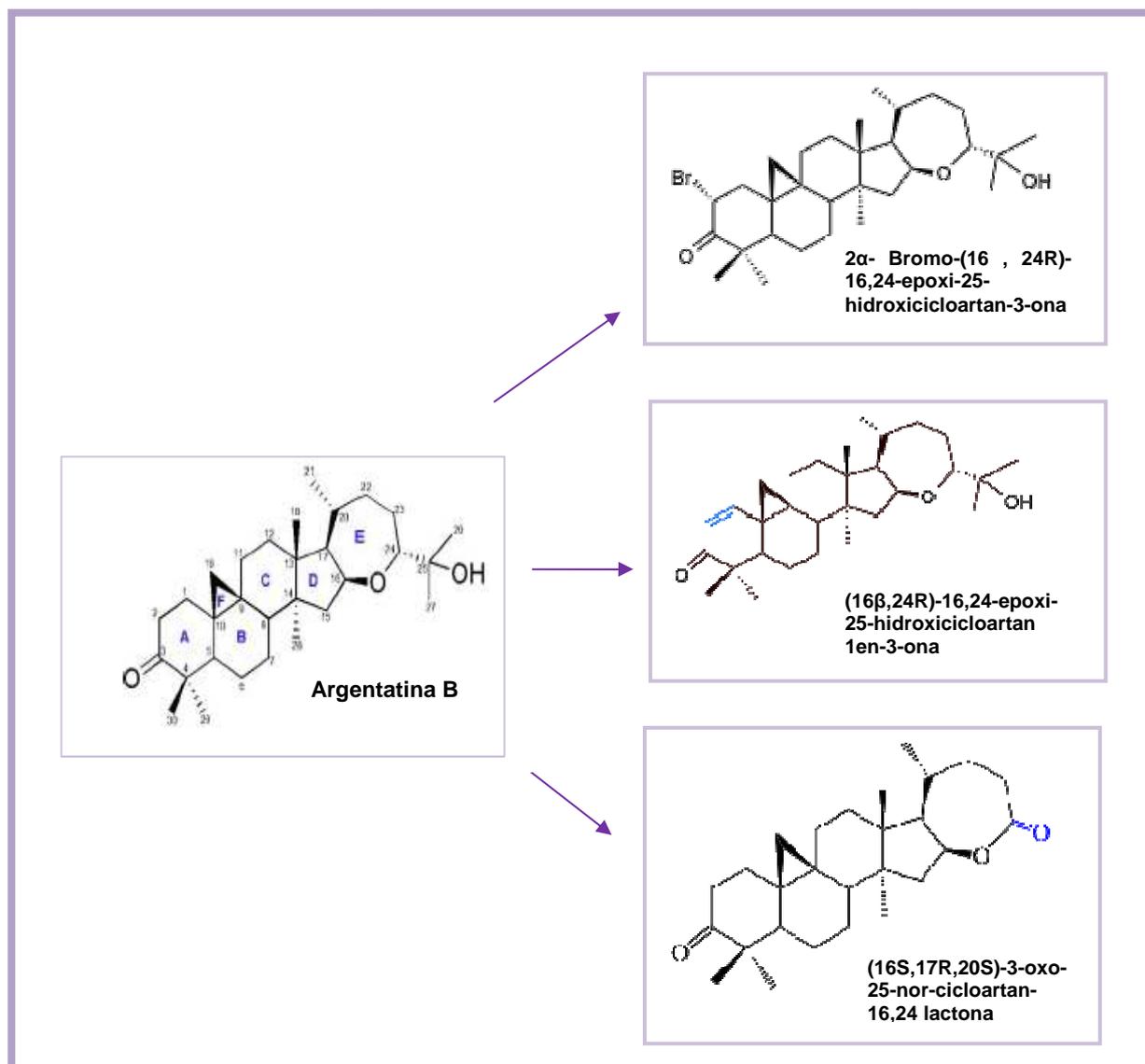
- Weinstein, I.B. (1978). Current concepts on mechanism of chemical carcinogenesis. Bull. NY Acad. Med. 54, 336-83.
- White, R. and Stegeman, J. (1996). Inactivation of cytochrome P4501A1 by 3,3,4,4-tetrachlorobiphenyl and the formation of reactive oxygen species. Abstracts, Society of Environmental Toxicology and Chemistry, Washington, DC, USA.
- Wogan, G. N. and Gorelick, N. J. (1985). Chemical and biochemical dosimetry to exposure to genotoxic chemicals. Environ. Health Perspec. 62, 5-18.
- Zhu M., Chang Q., Wong L.K., Chong F.S., Li R.C. (1999). Triterpene antioxidants from *Ganoderma lucidum*, Phytotherapy Research 13: 529-531

## **ANEXOS**

## ANEXO 1. Esquema del ensayo cometa.



## ANEXO 2. Transformaciones químicas de la Argentatina B



### ANEXO 3.

## XIV CONGRESO LATINOAMERICANO DE GENÉTICA (ALAG) VIII CONGRESO DE LA ASOCIACIÓN LATINOAMERICANA DE MUTAGÉNESIS, CARCINOGENESIS Y TERATOGENESIS AMBIENTAL (ALAMCTA) XLIII CONGRESO DE LA SOCIEDAD DE GENÉTICA DE CHILE (SOCHIGEN) XXXIX CONGRESO DE LA SOCIEDAD ARGENTINA DE GENÉTICA (SAG)

### RESUMEN 25

**CAMBIOS EN LA RESPUESTA GENOTÓXICA DE LA ARGENTATINA B Y SUS DERIVADOS** (Changes in genotoxic response of Argentatin B and its derivates) **Ramírez, M.**<sup>1</sup>, Ojeda, D.<sup>1</sup>, Bautista, G.<sup>1</sup>, Romero, J.<sup>2,4</sup>, Bailón, N.<sup>1,3</sup>, Martínez-Vázquez, M.<sup>3</sup>. <sup>1</sup>Centro de Biología Celular y Molecular, UTPL-Ecuador, <sup>2</sup> Instituto de Química Aplicada-UTPL, Loja-Ecuador, <sup>3</sup> Instituto de Biomédicas-UNAM, México, <sup>4</sup> Instituto de Química, UNAM-México. [tibelinda@gmail.com](mailto:tibelinda@gmail.com)

Cambios químicos hechos en moléculas con actividad farmacológica, tienen como fin desarrollar derivados más efectivos y menos tóxicos, incluyendo por supuesto la genotoxicidad. En nuestro trabajo evaluamos el daño al DNA de la Argentatina B, triterpeno de tipo cicloartano, citotóxico en líneas tumorales, así como de siete de sus derivados, en donde existe una relación estructura-actividad. Para lo cual, previo ensayos de citotoxicidad, se expuso a linfocitos humanos por 3 horas a distintas concentraciones de los compuestos. En todos los casos obtuvimos un comportamiento dosis-respuesta, la Argentatina B fue la más genotóxica, sin embargo compuestos citotóxicos más potentes como el formilado y el 2 $\alpha$ -bromado presentaron efecto genotóxico similar, así mismo para los compuestos con menor efecto citotóxico se observó menor efecto genotóxico.