



UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA

ESCUELA DE BIOQUIMICA Y FARMACIA

**EVALUAR LA ACTIVIDAD GENOTÓXICA DEL
EXTRACTO METANÓLICO DE *Gynoxis verrucosa*
MEDIANTE EL ENSAYO CBMN EN LA LÍNEA CELULAR
ASTROCITOMA CEREBRAL (D384).**

**TESIS DE GRADO PREVIA A LA OBTENCIÓN
DEL TÍTULO DE BIOQUÍMICO FARMACÉUTICO**

AUTORA:

Diana Janeth Herrera Torres

Directora:

Dra. Natalia Bailón Moscoso

LOJA – ECUADOR

2009

Dra.

Natalia Bailón Moscoso

DIRECTORA DE TESIS

CERTIFICA:

Que una vez revisado el trabajo de investigación realizado por la Srta. Diana Janeth Herrera Torres, previo a la obtención del título de BIOQUÍMICO FARMACÉUTICO, se autoriza su presentación final para la evaluación correspondiente.

Loja, Abril 2009

Dra. Natalia Bailón Moscoso

DIRECTORA

DEDICATORIA

Este trabajo está dedicado a Dios, porque sin su iluminación permanente a lo largo de mi vida estudiantil, no habría logrado terminar con éxito lo que me he propuesto hasta el día de hoy.

A mi familia que ha estado en cada momento de mi vida, ayudándome y dándome fuerzas para seguir adelante, pero en especial a mi querida madre que siempre ha estado a mi lado para apoyarme, darme la mano en las situaciones difíciles y enseñarme a no dejarme vencer por los obstáculos de la vida, a mi padre que ha sido un apoyo importante es este trabajo.

AGRADECIMIENTO

A la Universidad Técnica Particular de Loja, en la cual él Ph. Dr. Luís Miguel Romero Fernández, por haberme recibido durante mi vida universitaria, la cual ha sido una de las etapas más importantes y lograr ser útil a la sociedad.

Al Centro de Biología Celular y Molecular, por haberme acogido desde los primeros años de estudio universitario para aplicar mis conocimientos y desarrollar destrezas, permitiéndome crecer como persona ya que he pasado durante varios años junto a quienes laboran aquí

A la Escuela de Bioquímica y Farmacia, bajo la Dirección de la Dra. Paula Torres, por estar siempre presta a escuchar nuestras inquietudes de estudiante y por su lucha constante para mejorar nuestros conocimientos, formando así buenos profesionales. A la vez a mis Maestros quienes han dado lo mejor de sí, gracias a sus exigencias he logrado aprender de ellos cosas valiosas, no solo académico sino personalmente.

A la Dra. Natalia Bailón M, por ser mi Directora de Tesis, quien me ha ayudado en la realización de este proyecto y de quien he aprendido cosas muy valiosas, no solo académicas sino valores personales que los llevare presente en vida personal

A mi madre por su gran sacrificio que hizo para que yo tuviera lo mejor y terminara con éxito mi carrera y

A mis compañeros de aula y los CBCM por haberme acogido para formar un grupo de trabajo sólido, los cuales me enseñaron a ser responsables y trabajar juntos en equipo.

A mis amigos y amigas, quienes a pesar de mi carácter estuvieron ahí junto a mi cada momento para apoyarme, no dejarme caer, estuvieron siempre conmigo. Mil gracias a cada uno de usted los quiero mucho...

CONTRATO DE CESIÓN DE DERECHO DE TESIS

Yo, Diana Janeth Herrera Torres, 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 y tesis de grado que se realicen a través, o con el apoyo financiero, académico o institucional (operativo) de la Universidad”.

Diana Janeth Herrera T.
Tesisista

Dra. Natalia Bailón Moscoso
Directora de Tesis

INDICE DE CONTENIDOS

PAG

CERTIFICACIÓN	II
DEDICATORIA	III
AGRADECIMIENTO	IV
CONTRATO DE CESIÓN DE DERECHOS DE TESIS.....	V
ABSTRACT	VIII
RESUMEN	IX
OBJETIVOS	X
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Cáncer.....	1
1.1.1 Definición	1
1.1.2 Incidencia del cáncer	1
1.1.3 Características de la células cancerosas	3
1.1.4 Genética del cáncer	3
1.1.5 Tratamiento del cáncer	4
1.2 Las plantas una fuente de principios activos	6
1.2.1 Medicina tradicional de Loja	7
1.2.1.1. Investigación fitoquímica y usos de extractos vegetales de la familia de las Asteraceae.....	8
1.3 Genotoxicidad	12
1.4 Micronúcleos con bloqueo de citocinesis	15
1.4.1 Criterios de identificación de Células Binucleadas	20
1.4.2 Criterios de identificación de micronúcleos	21
2. MATERIALES Y METODOS	23
2.1 Control positivo.....	23
2.2 Control negativo	23
2.3 Obtención del extracto vegetal	24
2.4 Modelo biológico	24
2.5 Evaluación del Efecto citostático	25
2.5.1 Siembra	25
2.5.2 Cosecha	25
2.5.3 Tinción	26
2.6 Evaluación del Índice de división nuclear	26
2.7 Evaluación del efecto genotóxico	26
2.8 Análisis estadístico	27
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	28
4. CONCLUSIONES	36
5. BIBLIOGRAFIA	37

INDICE DE FIGURAS

Figura 2.4.1 Células de Astrocitoma cerebral (D-384)	24
---	----

Figura 2.7.1 Diagrama del Ensayo de Micronúcleos	27
---	----

INDICE DE TABLAS

Tabla 1.2.1. Información etnobotánica de <i>Gynoxis verrucosa</i>	10
Tabla 2.5.1.1 Esquema de tratamiento	25
Tabla 3.1. Porcentaje de células tratadas con <i>Gynoxis verrucosa</i> en la línea celular D-384	34
Tabla 3.2. Índice de división nuclear en la línea celular D-384 tratadas con <i>Gynoxis verrucosa</i>	35
Tabla 3.3. Frecuencia de micronúcleos en la línea celular D-384 tratadas con <i>Gynoxis verrucosa</i>	35

INDICE DE GRAFICAS

Figura.3.1. Efecto del extracto <i>G. verrucosa</i> en la proliferación celular	29
Figura 3.2. Índice de división nuclear.....	30
Figura 3.3. Efecto genotóxico, en las células D-384	34

INDICE DE IMAGENES

Figura 1.4.1. La formación de MN y formación de NPB en células que sufren la división nuclear	17
Figura 1.4.2. Posibles rutas de las células cultivadas con bloqueo de citocinesis expuestas a agentes citotóxicos /genotóxicos	18
Figura 1.4.3. Microfotografía de células de un ensayo de micronúcleos	20
Figura 1.4.4. Microfotografías de células binucleadas	20
Figura 1.4.5. Microfotografía de células binucleadas con micronúcleos	21
Figura. 1.4.6 Microfotografía de unas células polinucleadas (A) y células en proceso de apoptosis (B) y células en proceso de necrosis (C).	22

Abstract

Cancer is one of the health problems around the world because of its high incidence. It takes a huge social impact in developed and underdeveloped countries, so the search treatment alternative continues being a necessity. The secondary metabolites of vegetal origin are an important source to obtain new antineoplastic, so that the majority of them interact with DNA; it is important to know its genotoxic activity

Gynoxis verrucosa, it is used in traditional medicine in South Ecuador and its methanolic extract shows a cytotoxic activity in human tumor cell lines. Being a possible source of secondary metabolites with antineoplastic potential, so evaluating its genotoxic activity and cytostatic in the tumor cell lines D-384 (cerebral astrocytoma). The extract was evaluated by the cytokinesis-block micronucleus assay (CBMN), which let us establish that extract did not show cytostatics effect, but it increased the micronucleus frequency in the three proved concentrations.

Keywords: micronucleus test, *Gynoxis verrucosa*, genotoxic effect, cytostatic effect.

RESUMEN

El cáncer es uno de los problemas de salud mundial, debido a su alta incidencia, teniendo gran impacto social tanto en países desarrollados como en subdesarrollados, por lo que la búsqueda de alternativas de tratamientos sigue siendo una necesidad. Los metabolitos secundarios de origen vegetal son una fuente invaluable para la obtención de nuevos antineoplásicos, dado a que la gran mayoría de estos interactúan con el DNA, es importante conocer su actividad genotóxica.

Gynoxis verrucosa, es utilizada en medicina tradicional en el Sur del Ecuador, y el extracto metanólico de la misma presenta actividad citotóxica en líneas tumorales humanas, siendo una posible fuente de metabolitos secundarios con potencial antineoplásico, por lo que evaluamos su actividad genotóxica y citostática en la línea tumoral D-384 (astrocitoma cerebral). El extracto *Gynoxis verrucosa* fue evaluado mediante el ensayo de MN con bloqueo de la citocinesis, lo que nos permitió establecer que el extracto no muestra efectos citostáticos, pero si incrementa la frecuencia de micronúcleos, en las tres concentraciones probadas.

Palabras Claves: Ensayo de micronúcleos, *Gynoxis verrucosa*, efecto genotóxico, efecto citostático.

OBJETIVOS

GENERAL:

Evaluar la actividad genotóxica del extracto metanólico de *Gynoxis verrucosa* mediante el ensayo CBMN en la línea celular Astrocitoma cerebral (D384).

Específicos

Establecer el efecto citostático mediante Índice de División Nuclear en la línea celular Astrocitoma cerebral (D384).

Establecer el efecto genotóxico mediante la evaluación de Micronúcleos en la línea celular Astrocitoma cerebral (D384).

1. Introducción

1.1 Cáncer

1.1.1 Definición

El cáncer es un grupo de enfermedades caracterizadas por un crecimiento incontrolado y propagación de células anormales. El cáncer es causado por factores internos o factores externos; como factores internos tenemos las hormonas o el metabolismo de los nutrientes en las células, bacterias, parásitos, virus, y dentro de los factores externos: tabaco, productos químicos, la ocupación laboral y la luz del sol. Este proceso requiere de varios años, por ser un proceso complejo (Global Cancer Facts & Figures 2007; Phillips D. et al., 1995).

Se estima que del 5%-10% de todos los cánceres son hereditarios, es decir que las personas que heredan una determinada alteración genética tienen un alto riesgo de desarrollar cáncer. Estos factores causales pueden actuar juntos o en secuencia para iniciar o promover carcinogénesis. El desarrollo de la mayoría de los cánceres requiere de varios pasos que ocurren durante muchos años (Global Cancer Facts & Figures 2007).

1.1.2 Incidencia de cáncer

Se estima que hubo más de 12 millones de nuevos casos de cáncer en 2007 en todo el mundo, de los cuales 5,4 millones ocurrirán en los países desarrollados y 6.7 millones en los países subdesarrollados. Las estimaciones correspondientes para muertes de cáncer totales en 2007 son 7.6 millones (aproximadamente 20,000 muertes de cáncer por día). Se espera que en 2050, la carga mundial crezca a 27 millones de nuevos casos de cáncer (Global Cancer Facts & Figures 2007).

Los tipos de cáncer más frecuentes en todo el mundo son (por orden de mortalidad):

En los hombres: próstata (25%), pulmón (15%), colon y recto (10%).

En las mujeres: mama (26%), pulmón (14%), colon y recto (10%) (American Cancer Society, 2008)

Actualmente, dos de los tres cánceres principales en hombres (estómago e hígado) y mujeres (cuello uterino y estómago), en países subdesarrollados están siendo relacionados con una infección. El cáncer de estómago es una de las infecciones más comunes en todo el mundo y que se relaciona con el cáncer, seguidamente por el hígado y cuello uterino. Aproximadamente el 15% de todos los índices de cáncer en todo el mundo son atribuibles a infecciones. (Parkin DM. 2006). Este porcentaje es aproximadamente tres veces mayor en los países subdesarrollo (26%), que en los países desarrollados (8%) (Global Cancer Facts & Figures 2007).

En América Latina el cáncer es una de las tres primeras causas de muerte, al igual que en el Ecuador de acuerdo a los datos del INEC, la mortalidad por cáncer se ha incrementado en las últimas décadas. En Ecuador el cáncer gástrico es el más frecuente así como el de mayor mortalidad tanto en hombres como en mujeres. (Garrido H, et al., 2003; Calderón A, et al., 2006)

Dentro de nuestro país cada año hay 21.000 nuevos casos de pacientes afectados con cáncer. Los estudios revelan que en el Ecuador se producen al año alrededor de 55 mil muertes por distintas causas. Sin embargo, el 12% de los decesos tienen origen en el cáncer, especialmente de mama y cérvix (cuello uterino) en las mujeres y, próstata y estómago en los hombres (Yépez, 2006).

En lo que concierne a la provincia de Loja durante los períodos de 1997 al 2002 se han presentado un total de 3.566 casos (personas) de cáncer, de los cuales 41.47% son hombres, siendo los de mayor frecuencia: estómago, próstata, sistema hematopoyético (leucemia). En mujeres 58.52%, estos son: cérvix invasor, mama, piel, estómago. Además

durante el mismo periodo se observó que el total de casos dentro del cantón Loja fue de 1.615, siendo 40.06% hombres y 59.93% mujeres (Garrido, Yunga, 2003)

1.1.3. Características de las células cancerosas

Las células somáticas, en una proliferación maligna pasan diferentes fases, el proceso canceroso inicia por varias rutas, ya sea por una mutación (micromutación), por la pérdida de heterocigosis producto de la recombinación mitótica o por cambios en el número y estructura de los cromosomas (macromutación), con la consecuente proliferación celular pueden llegar a células cancerígenas y luego a invadir otros tejidos (Mudry M. et al., 2006).

Se razonan seis características en las células que dan origen al fenotipo completo del cáncer:

- *Autosuficiencia de señales de crecimiento*
- *Evasión de apoptosis (muerte celular programada)*
- *Angiogénesis*
- *Insensibilidad a las señales de inhibición del crecimiento*
- *Potencial replicativo ilimitado.*
- *Invasión tisular (metástasis)* (Hanahan, 2000).

1.1.4 Genética del Cáncer

Los eventos que conducen a la formación de tumores permiten definir las siguientes etapas: iniciación, promoción, progresión.

Fase de iniciación: Implica una alteración genética irreversible (mutación), produciendo una célula con un potencial de formar clones de células transformadas. Si bien las células transformadas adquieren la capacidad de clones transformados, los cambios genéticos que han sufrido no tienen una traducción morfológica identificable y no implica efectos clínicos. Una célula iniciada no es todavía un cáncer.

Fase de promoción: Caracterizada por el aumento de la población celular inducida, normalmente viene condicionada

por la presencia de un agente promotor y puede ser reversible si desaparece el promotor. Las células se mantienen euploides, sin experimentar cambios en el número y en la morfología de sus cromosomas.

Fase de progresión: Caracterizada por la progresiva heterogeneidad de las células tumorales, siendo la tendencia general hacia una creciente malignidad. La progresión puede afectar a las distintas propiedades celulares (proliferación, secreciones químicas, capacidad metastásica) en su conjunto o bien a una u otra por separado. (Paz y Miño C, 2002).

1.1.5 Tratamiento del Cáncer

Las principales formas usadas para tratar el cáncer son:

- Procedimiento quirúrgicos
- Quimioterapia sistémica
- Radiación

Los procesos quirúrgicos varían según el lugar donde está localizado el cáncer y lo avanzada que esté la enfermedad. Puede implicar la extirpación de una sección focalizada del órgano o tejido, o bien puede ser necesario un trasplante. El proceso de recuperación varía según el tipo de cirugía que se requiera (Hernández Martín A. et al. 2006.)

El tratamiento con quimioterapia se puede definir como un procedimiento terapéutico farmacológico que consiste en la utilización de fármacos denominados antineoplásicos, para el tratamiento del cáncer (García, 2000).

La quimioterapia detiene o demora el crecimiento de las células cancerosas, viéndose también afectadas las células sanas. La quimioterapia puede: *Curar el cáncer*, cuando se destruye tantas células cancerosas que en el cuerpo ya no se puedan detectar. *Controlar el cáncer*, evitando que se extienda o hacer que crezca más lentamente. También puede destruir las células cancerosas que se han extendido a otras partes del cuerpo. (National Cancer Institute. 2008).

El tratamiento del cáncer con antineoplásicos consiste en que la mayoría de las células cancerosas se destruyan, reduciéndolas al máximo a estas células para que no afecten a las células normales; sin embargo el principal problema de estos fármacos es que presentan un margen terapéutico muy estrecho y una elevada toxicidad debido a la incapacidad para diferenciar las células tumorales de las células sanas (Buendía- Rodríguez J., López Gutiérrez J., García Vega O. et al. 2008).

Varios de los citotóxicos más potentes actúan mediante daño del ADN, su toxicidad es mayor durante la fase S o de síntesis del ADN, en tanto que otros, como los alcaloides de la vinca y los taxanos, bloquean la formación del uso mitótico durante la fase M. Estos fármacos sólo tienen actividad contra células con una mayor velocidad de división, por eso, las neoplasias que muestran mayor susceptibilidad a quimioterapias son las que tienen un alto porcentaje de células en proceso de división (Goodman A. et al., 2003)

1.2 Las plantas, una fuente de principios activos

Desde décadas atrás en la medicina natural se han utilizado los principios de origen vegetal, inicialmente tomaron la forma de drogas crudas, extractos y otras formaciones herbales (Balunas, Kinghorn 2005). Por esta razón en las dos últimas décadas se ha reforzado la investigación y se continúa realizando el aislamiento y caracterización de componentes con actividad farmacológica (Gurib-Fakim, 2006).

Las plantas medicinales contienen mezclas de diferentes compuestos químicos, que pueden actuar separadamente o por sinergismo, particularmente los metabolitos secundarios han formado la base de la medicina y la presencia de estas sustancias es difícil de justificar en la naturaleza pero proveen una invaluable fuente de nuevas moléculas para la elaboración de fármacos (Gurib-Fakim A., 2006).

Numerosos principios activos de origen natural han resultado ser compuestos importantes a partir de los cuales se han logrado desarrollar cuantiosos fármacos, es por ello que el estudio de estos se mantiene vigente como una estrategia de búsqueda de nuevos agentes terapéuticos (Cragg, 2005).

En relación al tratamiento del cáncer, existen limitaciones en cuanto a quimioterapia se refiere, ya que muchas de las moléculas existentes carecen de selectividad y en algunos casos las células cancerosas desarrollan resistencia a ellas (De Vita, 2000).

Los agentes anticancerígenos provenientes de plantas comúnmente de uso clínico, son divididos en cuatro clases de componentes: alcaloides de la vinca, epipodofilotoxinas, taxanos, y camptotecinas. Numerosos derivados de los cuatro componentes han sido sintetizados y algunos tienen uso clínico actualmente. (Balunas M, et al., 2005; Cragg, 2005)

Los primeros agentes dentro del uso clínico fueron los alcaloides de la vinca (vinblastina y vincristina) aislados de la Vincapervinca rosa de Madagascar (*Catharantus roseus*), que fueron usadas por varias culturas para el tratamiento de la

diabetes. (Cragg G, et al., 2005). Los cuatro principales alcaloides derivados de la pequeña vinca fueron: vinblastina, vincristina, vinleurosina, vinrosina (Gurib, 2005).

Por otra parte los alcaloides del podófilo (etopósido, tenipósido) fueron aislados del *Podofillum peltatum*. Los taxanos (paclitaxel, docetaxel) fueron aislados del *Taxus brevifolia*. Finalmente las Camptotecinas (topotecán, irinotecán), fueron aisladas de *Camptotheca acuminata* (Cragg, 2005).

1.2.1 Medicina tradicional en Loja

La Organización Mundial de la Salud (OMS), ha estimado que aproximadamente un 80% de la población mundial ha utilizado productos de origen vegetal en el cuidado de la salud. Se calcula que los productos naturales representan alrededor del 50% de los fármacos de uso clínico en países desarrollados y de estos el 25% se derivan de plantas superiores. 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 (Parra, 2006).

La localización de la actividad biológica de un compuesto, ya sea de origen natural o sintético, se realiza a través de un programa de selección de la actividad biológica buscada, que establezca las bases para llevar el compuesto de interés a pruebas de nivel clínico (García F. 2003).

La búsqueda de drogas de origen vegetal involucra una combinación de técnicas botánicas, fitoquímicas, biológicas y moleculares; que juegan un rol importante en el tratamiento del cáncer (Parra, 2006).

Las familias de plantas más utilizadas por la población de la provincia de Loja y Zamora Chinchipe para la elaboración de sus remedios caseros son: Asteraceae, Lamiaceae, Solanaceae, Fabaceae, Onagraceae y Apiaceae. (Tene V, et al 2006)

1.2.1.1 Investigación fitoquímica y usos de extractos vegetales de la familia de las Asteraceae

La Familia de las Asteraceae, una de las más grandes cuenta aproximadamente con 23000 especies. Algunas plantas de esta familia son comestibles, o usadas como materia prima para diferentes industrias, otras presentan propiedades medicinales y muchas son ornamentales (Alverenga et al, 2005)

De la familia Asteraceae se han extraído lactonas sesquiterpénicas, además estas pueden ser causantes del efecto citotóxicos (Brunneton 1999) y anticancerígeno (Picman A 1986). Dentro de los usos de mayor relevancia se atribuye tratar el espanto, presión baja, de presión psicológica, problemas visuales, alergia, sedantes y cólicos, usada como desinfectante, para curar heridas, dolor de estomago, dolores hepáticos, problemas del riñón, infecciones, tratar fiebres a consecuencia de la malaria y fiebre amarilla (Tene V, et al 2006). Ciertos géneros de esta familia se caracterizan por poseer propiedades antiinflamatorias y propiedades antioxidantes (Parejo I, Viladomat F. 2003).

Dentro de la familia Asteraceae se encuentran las especies *Tagetes filifolia*, *Baccharis latifolia* que posee propiedades inmunomoduladoras, antiproteolíticas, antihemorrágicas, antioxidantes, antigenotóxicas y actividad antibacteriana (Quintana et al 2005) de aquí si han aislado metabolitos secundarios, como lactonas sesquiterpénicas y alcaloides sesquiterpénicos que posee un potente agente antitumoral (Sousa et al, 2007) y *Tagetes filifolia* tiene algunas propiedades medicinales como antiinflamatorias e hipotensoras, antibacterial, antifúngicas, anticancerígenas y antienvjecimiento (Pichette et al. 2005).

Estudio con el extracto *parthenolide*, actuando sobre la ruptura de indicción en células de mamífero, esta molécula no muestra genotoxicidad, caracterizada por los dobles enlaces presentes en α -metileno y γ -lactona y fracciones de ciclopentano, que confiere a su afinidad a lactonas

sesquiterpénicas hacia los grupos tiol de proteínas y glutatión. La citotoxicidad puede ser sólo parcial. Aberraciones cromosómicas fue el único efecto genotóxico documentado en lactonas sesquiterpénicas (Ramos A, et al. 2002). Otro estudio con extracto de partenina se ha aislado lactonas sesquiterpénicas, siendo utilizado en ensayos contra las células tumorales de líneas *in vitro* e *in vivo* con resultados positivos en términos reducción del tamaño tumoral y la supervivencia global (Ramos A, et al. 2002).

Dentro de esta familia se encuentra el género *Gynoxis verrucosa*, endémica de la provincia de Loja y Zamora Chinchipe, al cual se le atribuye propiedades curativas como para tratar presión sanguínea baja, de presión psicológica, problemas visuales y respiratorios y como sedante para cólicos (Astudillo 2006).

De los metabolitos secundarios de *Gynoxis verrucosa* se han aislado lactonas sesquiterpénicas como: dehidroleucodina, de la cual presenta actividad antiinflamatoria y actividad citotóxica, $1\alpha,10\alpha$ -epoxy- 2α -hidroxikauniolida; mismas que tienen estructura de lactonas sesquiterpénicas. Entre otros compuestos aislados están 3,4-dihidroxi-bisabola-1,10-dieno, que es un derivado del ácido bisabolánico, del cual no se ha reportado actividad biológica y el 2-(2-(acetoximetil)oxiran-2-il)-5-metilfenil isobutirato presenta una estructura similar a la partenina, la cual es capaz de dañar el ADN ocasionando rupturas de tipo cromatídicas, además de inducir formación de micronúcleos en eritrocitos de ratón (Malagon O. 2007).

Estudios realizados por Astudillo, con el extracto de *Gynoxis verrucosa* mostró un efecto citotóxico a concentraciones menores a 100ug/ml y efecto citostático a concentraciones menores a 10ug/ml considerándose como una fuente importante de sustancias anticancerígenas (Astudillo, 2006).

El extracto a trabajar ha sido seleccionado basándose en estudios de citotoxicidad de su extracto metanólico sobre la línea celular tumoral humana (D-384, Astrocitoma cerebral), obteniendo la dosis letal media (DL₅₀), es decir la dosis que mata al 50% de las células del extracto de *Gynosis verrucosa*

los valores obtenidos de la $IC_{50} = 22,06 \pm 10,7\mu\text{g/ml}$ (Astudillo, 2007), siendo una posible fuente de sustancias anticancerígenas, ya que el criterio de citotoxicidad para extracto totales es $DL_{50} < 50\mu\text{g/ml}$ según el Instituto Nacional del Cáncer (Itharat A. et al., 2004).

Gynoxis verrucosa

Número de Herbario	080 Planta de Productos Naturales U.T.P.L
Nombres Comunes	Guángalo Congona
Parte Usada	Hojas
Altitud	1800 – 2400 m.s.n.m
Provincia	Loja, Zamora Chimchipe
Lugar de Recolección	Cantón Zumba, Provincia de Zamora Chinchipe
Descripción Botánica	Arbusto que alcanza 4 m de altura, semileñosa, con médula esponjosa en los tallos. Hojas opuestas con pubescencias de color café blanquecino, en el envés lámina de 12–16cm x 7–9cm, inflorescencia en capítulos, flores marginales de color amarillo (Astudillo 2006)
 <p>Fotografía 2 Planta de <i>Gynoxis verrucosa</i> Fuente: Herbario N° 080 Planta de Productos Naturales U.T.P.L</p>	

Tabla 1.2.1. Información etnobotánica de *Gynoxis verrucosa*

Las plantas han formado parte del tratamiento del cáncer y han sido observadas por sus características curativas, sin embargo actualmente muchas personas que padecen de cáncer desean someterse a terapias de uso tradicional, esto se debe a los principios activos para que no se produzcan los efectos de la quimioterapia (Olalde, 2006). Además de los ensayos bioquímicos o de la actividad biológica, se requiere ensayos de genotoxicidad y con ello cumplir con las

consideraciones terapéuticas para el uso de los preparados fitoterapéuticos (Balunas, Kinghorn 2005).

Por lo mencionado hasta aquí, el objetivo del presente estudio es evaluar la actividad genotóxica del extracto metanólico de *Gynoxis verrucosa* en la línea celular D-384 (Astrocitoma cerebral)

1.3 Genotoxicidad

El papel es identificar y analizar la acción de toxicidad de agentes, dirigida hacia los componentes hereditarios de los sistemas vivos. Algunas sustancias tóxicas que dañan el complejo genético a diferentes concentraciones también pueden producir citotoxicidad aguda no específica y la muerte; el objetivo primario es descubrir interacciones con ácidos nucleicos y alteraciones de productos en elementos genéticos en concentraciones subcrónica. Las exposiciones de sustancias sirven para estudiar los rangos de toxicidad y ver si es aguda o crónica, determinar y observar cuales son los tipos de lesiones moleculares que las sustancias químicas inducen en el ADN y cuál es el resultado del daño genético (Brusick D., 1987).

El objetivo principal los estudios de genotoxicidad de diferentes agentes es el análisis de su posible acción como mutágeno, por medio de pruebas biológicas que pongan en claro el modo de actuar. Por medio de éstas se puede verificar si una alteración particular en el ADN se traduce en mutación, capaces de detectar distintos tipos de alteraciones relevantes para la salud, incluyendo micro y macromutaciones, así como carcinógenos potenciales que nos permiten estimar a corto plazo qué podría ocurrir cuando un compuesto dado llegue a tener acceso a ella *in vivo* o bien *in vitro*, elucidando así los mecanismos más probables implicados en el proceso mutagénico (Mudry, Carballo 2006).

Si se inicia la evaluación de la potencial actividad mutagénica de una droga, agente químico, físico y/o biológico, es probable que sea poco posible someterla a todos los ensayos posibles de corto plazo ya sea por los altos costos o por la necesidad del personal especializado que esto pudiera implicar. Por esto es importante analizar diferentes niveles de evaluación (diferentes niveles de “daño” al material genético) como parte del procedimiento de control toxicológico general, estableciendo un mínimo de ensayos de mutagenicidad que permita la caracterización del producto o agente en estudio. (Mudry, Carballo 2006)

Para detectar estos daños a nivel genético se pueden emplear un sin número de ensayos, llegando así a 4 niveles de evaluación de daño genético. En el *primer nivel* detecta mutaciones puntuales (ensayos en procariontes) como en el Test de Ames. El secundario (celular) utiliza cultivos de células en monocapa o en suspensión para caracterizar el daño genético en líneas celulares, como en el Test Micronúcleos. El tercero, aplicado en plantas y animales incluidos el hombre, analizando cambios en el individuo como un todo. Aquí se evalúa exposición de tipo laboral ocupacional o medicamentoso. El cuarto, análisis de carácter prospectivo y/o retrospectivo para poblaciones expuestas en forma accidental, laboral o por estilos de vida (Mudry, Carballo 2006).

Los distintos ensayos en Genética Toxicológica son utilizados para identificar agentes inductores del daño al material genético en células germinales y somáticas. Estos ensayos son capaces de detectar distintos tipos de alteraciones relevantes para la salud, incluyendo micro y macromutaciones, así como carcinógenos potenciales. Entre ellos consideramos los niveles de complejidad, desde bacterias hasta mamíferos incluyendo al hombre, se reúnen varios cientos de ensayos (Mudry M, et al., 2006).

Podemos aquí mencionar la toxicidad general (eficiencia en placa, test de viabilidad por exclusión del colorante, retraso en el ciclo celular). Se puede observar el daño primario en el ADN (intercambio de cromátidas hermanas, cometa). La reparación en células de mamíferos, (bacterias normales / deficientes en reparación). La microlesión génica (Test de Ames), mutación de genes y levaduras. La macrolesión (MN *in vivo* e *in vitro*, aberraciones cromosómicas). La transformación *in vitro* de líneas celulares. La activación metabólica y por último la regulación sistémica y orgánica (Mudry M, et al., 2006).

Los fármacos anti-cáncer más efectivos pueden mostrar actividad mutagénica y genotóxica, produciendo cánceres secundarios relacionados con los tratamientos terapéuticos. Por lo que es necesario las pruebas para la evaluación

genotóxica (Piloto J et al 2000) o antígenotóxica (Gutiérrez Z et al., 2004), de extractos vegetales, así como de compuestos aislados de fuentes vegetales (Sanjev N et al., 2006).

Algunos agentes antineoplásicos como la doxorubicina, cisplatina o la mitomicina C además de su efecto citostático, tiene importantes efectos adversos como la genotoxicidad. Por esta razón, resulta importante evaluar la genotoxicidad de cualquier compuesto con potencial antineoplásico. Estos efectos pueden ser evaluados en sistemas in vitro como en el ensayo de micronúcleos con bloqueo de citocinesis. (Parra H, et al., 2005)

1.4 Micronúcleos con bloqueo de citocinesis (CBMN)

Los ensayos de micronúcleos permiten evaluar la inestabilidad genética inducida por agentes antineoplásicos, es un indicador indirecto de rotura cromosómica (González, 2003) los cuales sirven para la inhibición y la proliferación de las células tumorales, ayudando a inhibir la formación del citoesqueleto, previniendo la replicación de ADN o la interferencia con los mecanismos de traducción de señales (Kirsch M, Fenech M. 2001; Parra H. García F, Monserrat 2005)

Desde muchos años atrás se ha tratado de perfeccionar esta técnica, la primera vez que se realizó el recuento de MN, como un daño cromosómico fue realizada en linfocitos humanos; y propuesta por Countryman y Heddle en 1976, pero en 1985 Fenech y Morley introdujeron el uso de la citocalasina B (Cyt B), que sirve para la inhibición y polimerización de la actina requerida para la formación del anillo de micro filamentos que participan en la división del citoplasma entre los núcleos hijos durante la citocinesis; en el año 1999 es donde el ensayo de MN fue validada a nivel mundial, desde ese momento es considerada como un biomarcador efectivo de daño en el ADN (Fenech, 1993; Fenech M et al., 2000; Fenech 2006; Zalacain 2005).

Los micronúcleos (MN) son pequeños cuerpos citoplasmáticos esféricos, son formados de material genético que se desprende y que queda excluido y no se incorpora correctamente al núcleo, quedando uno de menor tamaño en relación al primario (French, 1993; Roldán, 2002), se forman durante la mitosis de cromosomas acéntricos o fragmentos de cromatina y cromosomas/cromatina entero que no son incluidos en las células hijas (Fenech M et al., 2000). El análisis de MN es usado como una prueba de genotoxicidad y de biomonitoreo de exposición a genotóxicos y sus efectos en humanos (Norppa H. et al., 2003).

Los Micronúcleos se forman por una ruptura directa del ADN, replicación del ADN dañado o inhibición de la síntesis del ADN, por lo que ayudan a determinar la pérdida del

cromosoma y la mala segregación de cromosomas (no-disyunción). Se pueden originar de fragmentos acéntricos o cromosomas enteros que quedan retrasados en la anafase y fallan en su incorporación a los núcleos hijos durante la mitosis (French 1988).

Los que se derivan de cromosomas enteros son principalmente formados por alteraciones del huso mitótico, cinetocoro u otras partes del aparato mitótico así como también daño en subestructuras cromosómicas y alteraciones en la fisiología celular. (Albertini R.J. et al., 2000).

Es un evento importante en el cáncer y en el envejecimiento, ellos probablemente causen defectos en el huso mitótico, centrómero o como consecuencia de la irreparable estructura del cromosoma antes de la metafase (Fenech, 1993; Fenech 2006, Kirsch-Volders M, Fenech M., 2001).

La distinción entre mutágenos inductores de rotura del ADN (clastogénicos) y pérdida cromosómica/ no disyunción (aneugénicos) pueden ser identificados por la presencia del cinetocoro o por la presencia de secuencias ADN centromérico usando FISH lo que da una alta especificidad al ensayo de MN (Albertini et al., 2000), otra ventaja es su poder estadístico obtenido al contar un gran número de células (mil células) en relación a las contadas en el análisis de metafases (cien a doscientas células) (Mateuca R. et al., 2006).

La técnica de recuento de micronúcleos con bloqueo de citocinesis utilizando Citocalasina B, es un procedimiento rápido y de fácil implementación, ya que garantiza el recuento de estas en células que se dividen y que han completado su primer ciclo de división celular (segunda interfase), fácilmente reconocibles por su aspecto binucleado (Roldán, 2002; Dino A, 2000).

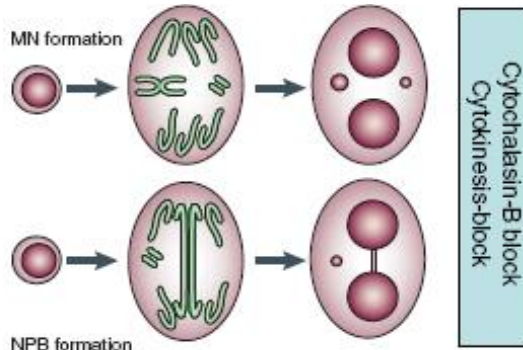


Figura 1.4.1. La formación de MN y formación de NPB en células que sufren la división nuclear. MN que se originan retrasándose cromosomas enteros o cromosoma del acéntricos, estos eventos se observan en células que completan división nuclear que es con su apariencia de BN después de citocinesis que bloquea con Cyt-B (Fenech M et al., 2007).

Los factores que influyen para que exista una variabilidad en la cantidad de micronúcleos en una célula es la edad, porque a mayor edad aumentan la frecuencia de micronúcleos, el género es mayor en mujer posiblemente a la aneuploidía del cromosoma X y que comúnmente aumenta con la edad, vitamina B12, tratamientos médicos, exposición diaria agentes genotóxicos, alcohol y procesos fisiológicos como (menopausia y osteoporosis), los agentes que reducen la frecuencia de MN son agentes antioxidantes, vitaminas E, C, beta-caroteno (Zalacain, 2005; Parra, 2005).

El ensayo de micronúcleos con bloqueo de citocinesis (CBMN) ha sido conocido como un método eficaz para la medida de rotura cromosómica, pérdida cromosómica, no disyunción, necrosis, apoptosis y citostático. (Fenech M et al., 2007).

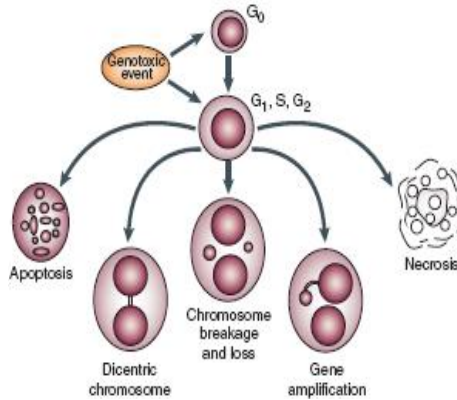


Figura 1.4.2. Posibles rutas de las células cultivadas con bloqueo de citocinesis expuestas a agentes citotóxicos/genotóxicos (Fenech M et al., 2007).

Usando estos biomarcadores dentro del ensayo CBMN es posible la medida de la frecuencia de rotura cromosómica (MN), pérdida cromosómica (MN), rearrreglo cromosómico, por ejemplo: cromosomas dicéntricos (NPB), amplificación de genes (nuclear buds), necrosis y apoptosis. En adición, el efecto citostático es medido por el radio de células mono-, bi- y polinucleadas. La pérdida cromosómica puede ser distinguida de roturas cromosómicas usando pruebas pancentroméricas y anticuerpos anti-cinetocoro y no disyunción (mal segregación de cromosomas) puede ser medida en células BN usando pruebas centromérica de cromosoma específico (Fenech M, et al. 2007).

El índice de micronúcleos proporciona fiabilidad de la ruptura del cromosoma y pérdida del mismo y se expresa en MNi en células que si han completado la división nuclear, se notan con la fase binucleada del ciclo celular, hay que resaltar que el ensayo no se puede usar en poblaciones celulares en que no se entiende bien la cinética de divisiones celulares y que no está controlada (Fenech M, 1993). Aunque en teoría los linfocitos en cultivo se dividan de forma sincronizada, en la práctica no ocurre de forma idéntica en todas las células del cultivo, de manera que se pueden encontrar en un mismo cultivo celular células mononucleadas, binucleadas y polinucleadas, células en vías de apoptosis y necrosis

(Zalacain, 2005). Lo que permite medir el índice de Micronúcleos es la genotoxicidad a la que se encuentran expuestos los linfocitos humanos a ciertos agentes que pueden causar daño en el DNA en un determinado punto del ciclo celular (Fisherman J, 1996).

El bloqueo de la citocinesis empleando Cyt B es la metodología que revolucionó la prueba de MN por ser efectiva para identificar células que solo se han dividido una vez en el tiempo de cultivo, porque permite observarlas con una apariencia binucleada debido al efecto inhibitorio de la Cyt B sobre la citocinesis sin alterar la cariocinesis. De esta manera, es posible observar células mononucleadas (CMN) que representan a las células que no se han dividido en el cultivo, las células binucleadas (CBN) y células tri, tetra o polinucleadas que son aquellas que se han dividido más de una vez en el tiempo de cultivo, permitiendo establecer un índice de proliferación, denominado como Índice de división nuclear (IDN). Este parámetro permite determinar el patrón de respuesta mitogénica inducida y de este modo establecer si el agente a prueba empleado en el estudio es capaz de inducir un efecto citostático. (García Fátima. 2000)

El IDN se calcula con la siguiente fórmula:

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

Donde:

CMN= células mononucleadas;

CBN= células binucleadas;

CPM= células polinucleadas, todas estas células son en un total de 200.

N= número de células totales analizadas

La frecuencia de cada población de células será determinada por un análisis microscópico, en el cual se observan características propias de cada población (García Fátima. 2000).

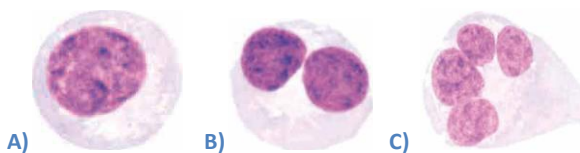


Figura 1.4.3. Microfotografía de células de un ensayo de micronúcleos. (a) mononucleadas, (b) binucleadas y (c) polinucleadas típicas. (Fenech M, et al 2007)

La determinación de la frecuencia de MN requiere la observación microscópica de CBN en la placa preparada a partir de los cultivos de células tratadas con el compuesto de interés. La evaluación de la frecuencia de MN se realiza analizando 1000 CBN, para lo cual se han descrito criterios de selección para reconocer tanto las células en las que se va a efectuar el recuento, como criterios para seleccionar los MN que presenten las características necesarias para ser reconocidos como tales y que el recuento realizado sea fiable y objetivo.

1.4.1 Criterios de identificación de Células Binucleadas

La célula debe ser binucleada, es decir presentar dos núcleos redondos u ovals, mantener su membrana casi intacta y distinguible de células adyacentes.

Los núcleos deben estar separados, ser de tamaño similar y presentar un patrón de tinción similar.

Los núcleos pueden tocarse pero no solaparse, la membrana nuclear debe distinguirse.

Ambos núcleos pueden encontrarse unidos por un puente nucleoplásmico.

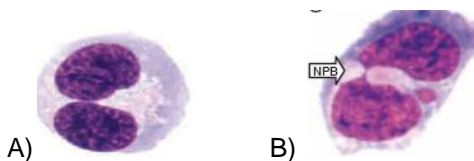


Figura 1.4.4. Microfotografía de una célula binucleada típica (a) y una célula binucleada que presentan un puente nucleoplásmico (b). (Fenech M, et al., 2007).

1.4.2 Criterios de identificación de micronúcleos

- Son de un cuerpo de forma redonda u oval.
- Su diámetro varía entre 1/16 a 1/3 del núcleo principal.
- Deben estar separados de los núcleos principales sin traslapamiento.
- No debe ser refringente
- Debe presentar las mismas características tintoriales del núcleo principal.
- Presentar la misma condensación de cromatina que los núcleos principales. (Fenech M, et al.,2003)

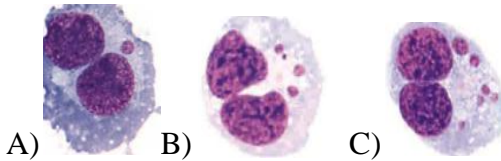
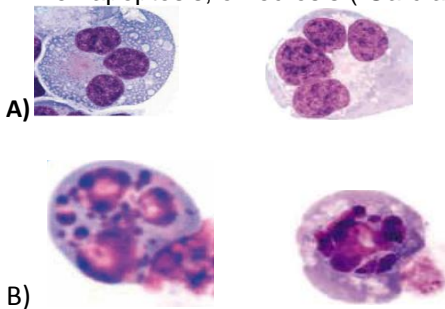


Figura 1.4.5. Microfotografía de unas células binucleadas con micronúcleos (A, B, C) (Fenech M, et al., 2003).

Para el análisis de la frecuencia de micronúcleos no se toma en cuenta:

- Células trinucleadas, tetranucleadas, o polinucleadas.
- Células donde el (los) núcleo (s) principal(es) se observen en apoptosis, o necrosis (García Fátima. 2000)





C)

Figura. 1.4.6 Microfotografía de unas células polinucleadas (A) y células en proceso de apoptosis (B) y células en proceso de necrosis (C). (Fenech M, et al., 2002).

2 MATERIALES Y METODOS

2.1 Control positivo:

Se utilizó Mitomicina C, se conoce que ésta conjuntamente con la Doxorubicina actúan a lo largo del ciclo celular de la Fase S (síntesis de ADN), este es un agente antineoplásico que interfiere en la síntesis de ADN. A dosis altas puede inhibir la síntesis de ARN y proteínas, ésta tiene una frecuencia <50% de toxicidad pulmonar asociada a la quimioterapia ya que puede interactuar con oxígeno, ciclofosfamida y radioterapia, por lo que se probará con dosis alrededor de 1uM para observar la frecuencia de micronúcleos (Kirsch M, Fenech M., 2001; González G. Domínguez H.,2003).

2.2 Control negativo:

Se uso Dimetilsulfóxido (DMSO) al 0.5%, partiendo de una concentración inicial del 100%, se usó este compuesto ya que se sabe que posee propiedades antioxidantes y por su baja toxicidad.

2.3 Obtención del extracto vegetal:

El extracto metanólico de *Gynoxis verrucosa* fue donado por la Planta de Productos Naturales de la UTPL. (Herbario Número 080 Planta de Productos Naturales U.T.P.L) El extracto de *Gynoxis verrucosa* fue disuelto en DMSO 0,5% por la capacidad que tiene de disolver los extractos vegetales, además por su propiedad de atravesar rápidamente las membranas celulares y por ser altamente dipolar.

2.4 Modelo biológico:

Los cultivos de líneas celulares se han empleados durante décadas como un sistema de prueba para la evaluación de efectos genóxicos tanto de sustancias química radiación ionizante, así como efectos en la proliferación celular. (García F .2000)

Las líneas celulares tumorales son derivadas de diferentes tumores humanos y cultivadas en el laboratorio *in vitro*. Estas células fueron aisladas y mantenidas por primera vez por el Instituto Nacional de Cáncer Americano en los años de 1985 a 1995 logrando determinar un total de 60 líneas derivadas de siete tipos de cáncer. Dichas células fueron ensayadas en diversas pruebas de crecimiento celular y viabilidad (Requena L., 2006).

Las células D-384 de Astrocitoma cerebral fueron derivadas de un cáncer de cerebro humano. Las células expresan proteínas de bajo, medio y alto peso molecular, también contienen una vesícula de membrana llamada sinaptofisina (Requena L., 2006).

Su mantenimiento se realizó con medio Dulbecco's (DPBS), suplementado con suero fetal bovino 10%, L-glutamina 1% antibiótico antimicótico 1% (Gibco), Piruvato de Sodio 1%, Aminoácidos no esenciales 1% y bicarbonato de sodio 2%. El medio se esterilizó por filtración al vacío.

Las condiciones a las cuales se mantuvieron los cultivos fueron a 37°C de temperatura, atmósfera húmeda 5% de CO₂ y en cajas de cultivo de 10ml.

Para su apropiada conservación se realizaron, revisiones y cambios de medio diario; además para la obtención de subcultivos se lavó con Buffer salino de fosfatos (PBS) y se colocó tripsina 10% (Sigma).

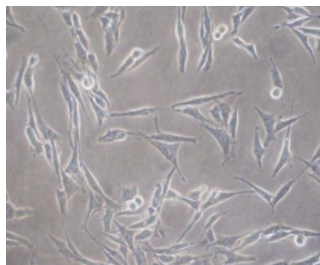


Figura 2.4.1. Células de Astrocitoma cerebral (D384).

2.5 Evaluación del Efecto citostático en la línea celular Astrocitoma cerebral D-384

Para determinar el posible efecto citostático del extracto metanólico de *Gynoxis verrucosa* se empleo la técnica de micronúcleos con bloqueo de citocinesis (CBMN), se utilizo la línea celular D-384 (Astrocitoma cerebral) realizando tres experimentos por duplicado, se siguió el siguiente proceso:

2.5.1 SIEMBRA

- Se realizó en cajas petri plásticas de 1ml, se coloco un cubre objetos, adicionando 1ml de medio Dulbecco's, se adicono 150.000 células y se observó al microscopio.
- Los cultivos se incubaron a 37°C durante 24 horas, con una concentración 5% de CO₂.
- Transcurrido el tiempo de incubación a cada uno de los cultivos se les cambio el medio Dulbecos y se agregó a los cultivos 33ul de Citocalasina B (4.5ug/ml) se trataron de acuerdo al siguiente esquema (Tabla 2.5.1).
- Luego se incubaron durante 24 horas más a 37°C.

GRUPO	TRATAMIENTO			
	Vehículo	Concentraciones de prueba	MMC	Citocalasina B
Cont. positivo MMC	DMSO	----	1 uM (5ul)	4.5ug/ml (33 ul)
Concentración 25 ug/ml	DMSO	25ug/ml (62,5ul)	----	4.5ug/ml (33 ul)
Concentración 20ug/ml	DMSO	20ug/ml (50ul)	---	4.5ug/ml (33 ul)
Concentración 10ug/ml	DMSO	10ug/ml (25ul)	----	4.5ug/ml (33 ul)
Cont. negativo DMSO	< 0.5%	----	----	4.5ug/ml (33 ul)

Tabla 2.5.1 Esquema de tratamiento

2.5.2. COSECHA

- Después del tiempo de incubación, a cada una de las cajas se las observó al microscopio, se eliminó el medio

de cultivo y se le adiciona 1ml de PBS lentamente y se elimina

- Se adicionó 200ul de PBS y 200ul de fijador de carnoy (Metanol- Ac. Acético 3:1) frio escurriéndolo lentamente por las paredes de la caja petrí moviendo suavemente y se retira.
- Se adicionó 1000ul de fijador de carnoy por un minuto se lo retira y luego dejamos secar por toda la noche.

2.5.3 TINCIÓN

- Se colocó el portaobjetos durante 20 min, en colorante eosina y después 15 min con giemsa, se enjuagó con agua destilada y se dejó secar, para luego observar al microscopio.
- En la evaluación del efecto citostático se determinó la frecuencia de células mono-, bi- y polinucleadas analizando 200 células por placa; y con estos datos se calculó el Índice de División Nuclear.

2.6 Evaluación del Índice de división nuclear

$$IDN = [CMN + 2 (CBN) + 3 (CPN)] / N$$

2.7 Evaluación del efecto genotóxico

Se evaluó el efecto genotóxico del extracto metanólico de *Gynoxis verrucosa*, empleando las mismas preparaciones con las que se evaluó el efecto citostático. Se analizó la frecuencia de CBN con micronúcleos en un total de 1000 células binucleadas por placa.

DIAGRAMA DEL ENSAYO DE MICRONUCLEOS

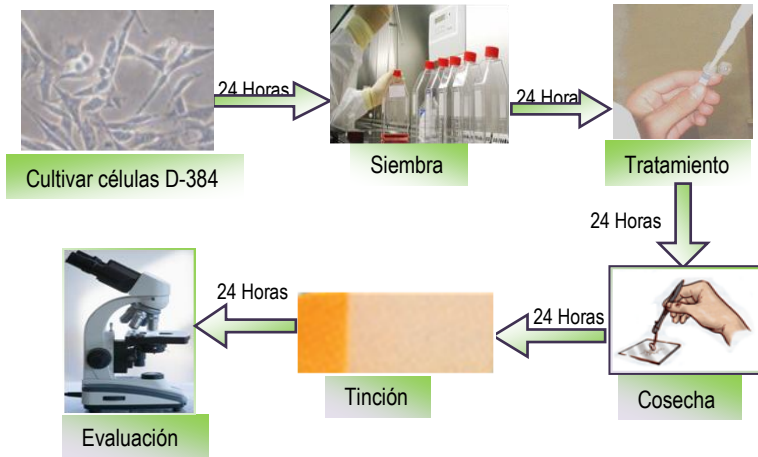


Figura 2.7.1 Diagrama del Ensayo de Micronúcleos en la línea celular D-384 (Astrocitoma cerebral)

2.8 Análisis estadístico.

Se utilizó el análisis de Anova para analizar la diferencia significativa de los resultados entre el grupo control y los grupos tratados. Valores $p < 0.05$ fueron considerados significativos.

3 Resultados y Discusión

El ensayo de micronúcleos con bloqueo de la citocinesis (CBMN), permite diferenciar entre compuestos genotóxicos y no genotóxicos, además de identificar aquellos que no permiten una adecuada segregación de los cromosomas durante la mitosis (Andrighetti-Frohner C et al, 2006). Ya que si el compuesto induce la formación de MN se dice que interactúa directamente al ADN (actividad clastogénica) y/o perturbar la “maquinaria mitótica” generando aneuploidias, causando un daño indirecto al ADN. Por tanto, este ensayo permite determinar el daño del ADN en varios niveles lográndose realizar tanto *in vivo* como *in vitro*.

El ensayo de micronúcleos es uno de los test más utilizados para evaluar el daño cromosómico, ya que permite evaluar en forma confiable tanto la pérdida de cromosomas, como la ruptura de los mismos, evaluando parámetros citostáticos, citotóxicos y genotóxicos por lo que se ha utilizado tanto para la inspección de los productos químicos así como la evaluación de agentes farmacéuticos o de extractos vegetales (Salazar A et al, 2009), por lo que lo hemos empleado para el estudio del extracto metanólico de *G. verrucosa*, un extracto con actividad citotóxica en líneas tumorales humanas. De las líneas celulares evaluadas la línea celular D-384, fue la más sensible (IC_{50} es de $22,06 \pm 10,7\mu\text{g/ml}$), razón por la cual la utilizamos como modelo biológico empleando 3 dosis cercanas para la evaluación del efecto citostático y genotóxico.

El índice de la proliferación celular da cuenta de la velocidad de división celular siendo un indicativo del grado de toxicidad, identificando agentes que causen retraso en el ciclo celular. (Martínez González V. 2006).

Se utilizó la cinética de proliferación celular (CPC), para lo cual se evaluó la proporción de células mono (M), bi (B), o polinucleadas (P). Se observó un incremento en el porcentaje de células mononucleadas y una disminución de las células binucleadas en las tres concentraciones probadas sin ser dosis dependiente. Figura (3.1)

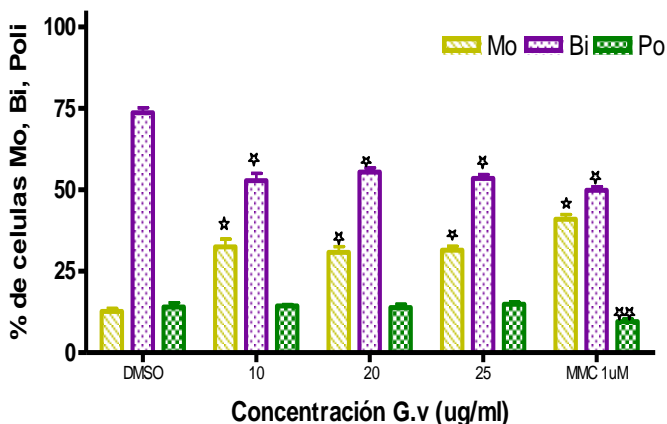


Figura.3.1. Efecto del extracto *G. verrucosa* en la proliferación celular. Porcentaje de células Mono, Bi y Poli. La MMC se empleó como control positivo, y DMSO como control negativo. Los resultados se muestran como la media \pm EE de tres experimentos independientes que se realizaron por duplicado (N=6). Usamos T. de DUNETT. *P<0.00001, **P<0.008.

El índice mitótico se basa en el grado de proliferación celular como respuesta a la presencia de un agente externo y se define como el porcentaje de células que contienen cromosomas condensados en una etapa del ciclo celular, la mitosis (Singh y col, 1988; Rojas 1992; Ostrosky-Wegman, 1994).

Una vez observadas las proporciones de células mononucleadas, binucleadas o polinucleadas como resultado del tratamiento con *G. verrucosa*, se calculó el índice de división nuclear (IDN). Como se puede observar en la Figura (3.2), el extracto de *G. verrucosa* no presentó efectos citostáticos en el modelo de prueba.

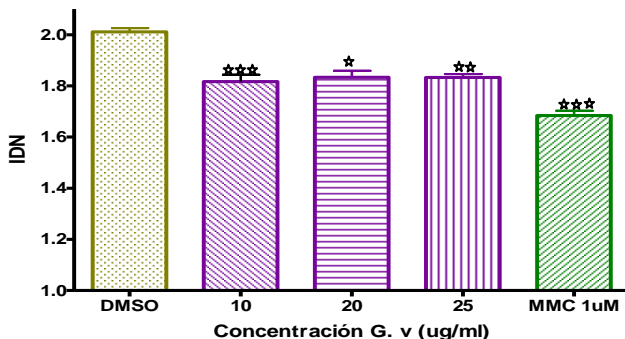


Figura 3.2. Índice de división nuclear calculado para línea celular D-384 tratadas con *G. verrucosa*. MMC como C. positivo y DMSO como C. negativo. Cada barra representa la media \pm EE de tres experimentos independientes por duplicado. Usamos T. de DUNETT. *** $P < 0.00001$; ** $P < 0.00002$; * $P < 0.00003$

El extracto *G. verrucosa*, tiene un efecto citostático a partir de 10ug/ml en células CHO-K1 medido mediante curva de crecimiento clonal, precisando que este test se lleva a cabo con exposición de varios días y tomando en cuenta que la cantidad de células sembradas es de baja densidad, en cambio en el test de micronúcleos, la exposición al extracto es de sólo 24 horas y la cantidad de células sembradas es en gran cantidad. Por lo que podemos establecer que el efecto citotóxico o cistostático puede variar dependiendo de la naturaleza del estudio, o simplemente si su metabolismo se ve alterado (Buckberry, 1999).

Siendo así la línea celular CHO K-1 (células epiteliales de ovario de *hámster chino*) es una línea simplemente transformada, mientras que en nuestro caso la línea es de tipo tumoral derivada de cáncer de cerebro humano D-384 (Astrocitoma en grado IV más invasivos) (García Álvarez I., 2008). Esta diferencia en el modelo utilizado y en la diversa sensibilidad de cada una de las técnicas, (Padmaja R et al 2002) podría explicar la diferencia de los resultados obtenidos.

Otros antineoplásicos como el Carboplatino (5 ug/ml), presenta efectos distintos cuando los modelos biológicos son diferentes es así que en linfocitos humanos no es citostático,

mientras que en las células CHO, si tiene efecto citostático (González M., et al 1995). En el caso del tamoxifeno, a pesar de utilizar 2 líneas celulares [MCF-7 (1 μ M), MDA-MB468 (20 μ M)] de cáncer de mama a las concentraciones a las que se observa el efecto citostático varía. A dosis superiores a 2,5 μ M aumento en el efecto citostático en MCF-7 (Salamia S. et al, 2003). De ahí la importancia de evaluar en distintos modelos biológicos y con diferentes test para poder establecer su actividad biológica.

Se evaluaron los efectos genotóxicos del extracto en función de la frecuencia de micronúcleos, para ello, se empleó el modelo celular D-384, cuya citocinesis se inhibió por la citocalasina B, bajo los lineamientos propuestos por Fenech (Fenech 2007). Al ser expuestas al extracto metanólico de *Gynoxis verrucosa*, hay un incremento estadísticamente significativo de MN en CBN conforme se incrementan las dosis (Figura 3.3).

Sobre la actividad genotóxica de este extracto se observa el incremento de la frecuencia de MN a partir de 1 μ g/ml en linfocitos humanos CBN (Toledo, 2007), así como el hecho de que puede incrementar el daño al ADN a partir de 0.01 μ g/ml, medido mediante el ensayo cometa, otro de los test de genotoxicidad, pero que se sabe que más sensible (Vintimilla, 2007).

Los fármacos contra el cáncer más efectivos presentan actividad mutagénica y genotóxica, produciendo cánceres secundarios relacionados con los tratamientos terapéuticos. Por lo que se realiza la evaluación genotóxica (Piloto J., et al, 2000) o antígenotóxica (Gutiérrez Z et al., 2004), de extractos vegetales, así como de compuestos aislados de fuentes vegetales (Sanjev N et al., 2006; Apel M, et al 2006), para que puedan servir como antineoplásicos de selección.

Como fuente de actividad biológica están las Asteraceae de las que se aíslan lactonas sesquiterpénicas, así por ejemplo de *Neurolaena lobara*, con un efecto antiplasmodial, anti-tumoral, anti-inflamatorios, contra migraña y efectos neurotóxicos, (Kintzios S.E., 2008, Alcalde S., et al 2007;

Blanco J., et al 2001). Al igual *Artemisia annua* ha sido usada para tratar fiebre y la malaria. (Itokawa H., et al 2008). *Tanacetum parthenium* por poseer propiedades antimicrobianas y anti-inflamatorias, induciendo a apoptosis y reducción de metástasis, actividad *in vitro* contra *Trypanosoma cruzi*. (Izumi E., et al 2008; Cerdeiras M., et al 2007).

Del extracto de *G. verrucosa* se han aislados lactonas sesquiterpénicas como: dehidroleucodina $1\alpha,10\alpha$ -epoxy- 2α -hidroxikauniolida; al igual que compuestos derivados del ácido bisabolánico. (Malagon O. 2007).

Las lactonas sesquiterpénicas, son conocidas por su actividad citotóxica, y su capacidad de inhibir tumores (Alcalde S., et al 2007; Bauer R. et al 2007; Blanco J., et al 2001, Cerdeiras M., et al 2007, Kintzios S.E., 2008, Lozaya M., et al 2008), además desde hace varias décadas se conoce que este tipo de metabolitos secundarios tienen esta actividad ya que de acuerdo con su estructura química son capaces de alquilar macromoléculas que regulan el crecimiento tales como enzimas. (Picman A., 1986).

Es así que se han aislado millerenolida y thieleanina, en donde se han realizado estudios tanto *in vitro* e *in vivo* conociendo así sus propiedades anti-inflamatorias y han sido evaluadas por sus actividades anti cancerígenas, por lo que se ha demostrado un efecto anti cancerígeno *in vivo* previsto a un mecanismo y una directa citotoxicidad (Bauer R. et al 2007; Lozaya M., et al 2008). Partenina es capaz de producir daños en cromosomas de linfocitos humanos, además de inducir a la formación de micronúcleos en eritrocitos de ratón Swiis. (Picman A., 1986, Izumi E., et al 2008).

Por otro lado, las lactonas sesquiterpénicas pueden llegar a ser muy tóxicas, se cree que tendrían una capacidad alquilante, uniéndose a grupos nucleofílicos como los sulfidrilo y amino de las proteínas, ya que actúan como alquilantes (Gershenzon and Croteau, 1991).

Dentro del grupo de antineoplásicos efectivos se encuentran los agentes alquilantes, son capaces de formar enlaces covalentes con ADN, sobre todo con las bases purínicas de una sola molécula o entre varias moléculas del ADN, resultando en la fragmentación de la molécula, lo que conlleva a la inducción de apoptosis. Por otro lado, los agentes alquilantes inducen la formación de nucleótidos dispares llevando a mutaciones puntuales (Fidler, I.J. et al. 2002; Dawson J., et al. 2003). Los agentes alquilantes de mayor uso son los que resultan efectivos contra enfermedades malignas, ya sean tumores sólidos o trastornos hematológicos, entre los más utilizados están: la ciclofosfamida, mecloretamina, melfatan, (Lane L., et al. 1999), y el cisplatino (Platinol), dacarbazina. (Sándor E., 2002). Ya que estos compuestos actúan a lo largo del ciclo celular y provocan gran variedad de efectos sobre el material genético de las células expuestas efectivamente incrementan la frecuencia de MN como es el caso del cisplatino, ciclofosfamida, pentamidina e incluso la mitomicina C, que fue utilizada en este estudio como control positivo (Hidalgo, 2001; Patiño, et al 2001). Por lo que muy probablemente las lactonas sesquiterpénicas presentes en el extracto son las responsables del efecto genotóxico observado, así mismo se conoce que las lactonas sesquiterpénicas afectan la formación del huso mitótico y de inducir la división directa o amitosis. (Picman A., 1986, Kintzios S.E., 2008), por lo que podría indicar el incremento de MN obtenido en este estudio; por lo que puede ser de tipo aneugénico, como clastogénico, lo cual sería importante determinar.

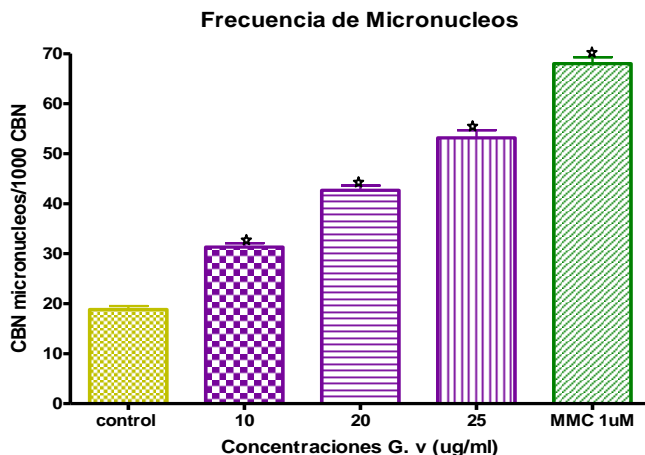


Figura 3.3. Efecto genotóxico, en las células D384, expuestas a diferentes concentraciones de *G. verrucosa*. Se empleó como control positivo MMC 1 μ M. Los resultados son de tres experimentos independientes que se realizaron por duplicado. Usamos T. de DUNETT. *P> 0,00001.

Finalizando este trabajo podemos decir que las células D-384 tratadas con el extracto metanólico de *Gynoxis verrucosa* mostraron un porcentaje de células mononucleadas, binucleadas y polinucleadas observadas en la Tabla 3.1.

Tabla 3.1 Porcentaje de células tratadas con *Gynoxis verrucosa* en la línea celular D-384

Concentraciones	Mono \pm EE	Bi \pm EE	Poli \pm EE
DMSO 5%	13 \pm 3,589	74 \pm 2,606	13 \pm 3,614
10ug/ml	33 \pm 8,732	53 \pm 8,766	14 \pm 0,491
20ug/ml	31 \pm 7,380	55 \pm 7,697	14 \pm 0,197
25ug/ml	32 \pm 8,275	53 \pm 8,546	15 \pm 0,858
MMC 1uM	41 \pm 12,321	50 \pm 10,182	9 \pm 3,417

Mientras que en la **Tabla 3.2** se observa el índice de división nuclear que no presentó un efecto citostático evidente en la línea celular tratada con el extracto metanólico de *G. verrucosa*.

Tabla 3.2 Índice de división nuclear en la línea celular D-384 tratada con *Gynoxis verrucosa*

Concentraciones	200 células ± EE
DMSO 5%	2,0110 ± 4,989
10ug/ml	1,8169 ± 6,492
20ug/ml	1,8432 ± 5,676
25ug/ml	1,8239 ± 5,954
MMC 1uM	1,6738 ± 10,944

Por último tenemos la Tabla 3.3 en donde el extracto metanólico de *G. verrucosa* indujo un incremento en la frecuencia de micronúcleos indicando que el extracto es capaz de provocar daño al ADN como resultado de eventos clastogénicos o aneugénicos.

Tabla 3.3 Frecuencia de micronúcleos (MN) en la línea celular D-384 tratada con *Gynoxis verrucosa*

Concentraciones	MN/1000 células ± EE
DMSO 5%	19 ± 6,707
10ug/ml	31 ± 8,004
20ug/ml	43 ± 15,429
25ug/ml	53 ± 22,226
MMC 1uM	68 ± 31,829

Es un hecho que la generación de nuevos agentes antineoplásicos es una necesidad; es indispensable la generación de compuestos con capacidad antiproliferativa en las células de cáncer, pero con menos efectos tóxicos a las células normales, para lo cual se necesita seguir investigando derivados de estos metabolitos, por lo cual se podría seguir utilizando la técnica de MN, por ser práctica y accesible, útil para evaluar la inestabilidad genética inducida por agentes genotóxicos.

4 Conclusiones

El extracto metanólico de *Gynoxis verrucosa* a las concentraciones de 10, 20 y 25ug/ml no tiene un efecto citostático en la línea celular de Astrocitoma cerebral D-384 evaluadas mediante el índice de división nuclear

El extracto metanólico de *Gynoxis verrucosa* tiene un efecto genotóxico produciendo un daño significativo en la línea celular de Astrocitoma cerebral D-384 evaluadas mediante la frecuencia de MN a las concentraciones probadas de 10, 20, 25ug/ml en células binucleadas.

Bibliografía:

- Astudillo G. 2007. “Estudio citotóxico de plantas medicinales de la Región Sur del Ecuador: *Baccharis latifolia*, *Callisia repens*, *Crotalaria* ssp., *Gynoxis verrucosa*, *Lidwigia 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.
- Alverenga S. Ferreira M. Rodrigues G, 2005. Emerenciana V. a general survey and some taxonomic complications of diterpenes in the Asteraceae. *Botanical Journal of the Linnean society* 147,291-308.
- Andrighetti-Frohner C., Jadel M., Kratz A., Creczynski-Pasa T., Barardi C., Simões C. 2006. In vitro testing for genotoxicity of violacein assessed by Comet and Micronucleus assays. *Mutation Research* 603. 97–103
- Apel M., Lima M., Souza A., Cordeiro I., Young M., Sobral M., Suffredini I., Moreno P., 2006. *Screening of the biological activity from essential oils of native species from the atlantic rain forest*. *Revista Cubana de Farmacia* vol. 40:75.
- Álvarez B. 2005. Estudio de la actividad específica pirrolidón carboxipeptidasa(PCP) en las líneas celulares de cáncer de mama humano estrógeno-dependiente y estrógenos-independientes MCF-7 y EVSA-T y su respuesta al estradiol y el tamoxifeno. *Revista Cubana* vol. 67:95-126.
- Alcalde S., Gorzalczy S., Flores M., Córdoba O., Höcht C., Taira C., 2007. Pharmacological evaluation in relation to phytochemical composition of decoction of flowers from *Chiliotrichum diffusum* (G.F.) K. (Asteraceae. *Plant. Med. Aromaticas* Vol. 6 (6).
- Blanco J., Gil R., Meragelman T., Genti-Raimondi S., Flury A., 2001. Aromatase Inhibition by an 11,13-Dihydroderivative of a Sesquiterpene Lactone. Vol. 297, Issue 3, 1099-1105.
- Bauer R. et al 2007. 55th International Congress and Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant. *Planta Med*; 73: 797–1034
- Balunas M. Kinghorn D. 2005. Drug discovery from medicinal plants. *Life Sciences* 78. 431-441

- Buendia J, López J, García A. 2008. Drug prescription patterns in patients attended at a middle- and high-complexity level institution. *Rev. salud pública*, vol.10, no.4, p.605-614. ISSN 0124-0064
- Barnes J.A., Collins B.W., Dix D.J., Allen J.W., 2002. Effects of heat shock protein 70 (Hsp70) on arsenite-induced genotoxicity *Mol. Mutagen.* 40:236-242.
- Cragg G, Newman D. 2005. Plants as a source of anti-cancer agents. *Journals of Ethnopharmacologia* 100: 72-79
- Calderón A, Vázquez Y, Pablo N. Solís P, Caballero-George C, Zacchino S, Jiménez A, Pinzon R., 2006. Screening of Latin American Plants for Cytotoxic Activity. *Pharmaceutical Biology* Vol. 44, No. 2, pp. 130–140
- Cerdeiras M., Horvath F., Montfalcon A., Vázquez A., 2007. Study of antimicrobial metabolites of *Xanthium cavanillesii*. *Plant. Med. Aromaticas* Vol. 6 (6).
- De Vita J., Hellman S, Rosenberg A., 2000. *Cáncer Principios y Práctica de Oncología*, Volumen. Quinta ed. Editorial Panamericana.
- Dino A, Oriana N, Maurizio M., 2000, Disease-Free Survival Advantage of Adjuvant Cyclophosphamide, Methotrexate, and Fluorouracil in Patients With Node-Negative, Rapidly Proliferating Breast Cancer: *Clin Oncol*; 18: 3125-34.
- Dawson J., Taylor M., Moreno A., Reide P., 2003. Lo esencial en Farmacología. Edition: 2.Publicado por Elsevier España, ISBN 8481746940, 9788481746945266 ppg.
- Fenech M. 2007. Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. *Nat Protoc.*; 2(5):1084–1104.
- Fenech M. 2000. The in vitro micronucleus technique. *Mutation Research* 455: 81- 95
- Fenech M. 2006. Cytokinesis-block micronucleus assay evolves into a “cytome” assay of chromosomal instability, mitotic dysfunction and cell death *Mutation Research* 600: 58–66
- Fenech M. 1993. The cytokinesis-block micronucleus technique: a detailed description of the method and its application to genotoxicity studies in human populations. *Mutat Res*; 285: 35-44.

- French M., 1988. Epirubicin Study Group. A prospective randomized phase III trial comparing combination chemotherapy with cyclophosphamide, fluorouracil, and either doxorubicin or epirubicin. *Clin Oncol*; 6: 679-88
- Fenech M., Chang W., Kirsch M., Holland N., Bonassi S., Zeiger E., 2003. Human project: detail description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures. *Mutation Research* 534: 65-75.
- Fidler, I.J. et al. 2002. "The Seed and Soil Hypothesis: Vascularization and Brain Metastasis." *The Lancet Oncology*. 3: 53-57.
- Fisherman J., Cowan K., Noone M., Denicoff A., Berg S., Poplack D., Balis F., Venzon D., McCabe M., Goldspiel B., Chow C., Ognibene F and O'Shaughnessy J., 1996. Phase I/II study of 72 h infusional paclitaxel and doxorubicin with granulocyte colony stimulating factor in patients with metastatic breast cancer. *J. Clin. Oncol.*, 14, 774±782.
- García F, 2000. Evaluación de los efectos citotóxicos, citostáticos y genotóxicos de las Argentatinas A y B. Tesis de grado previa a la obtención del título de Química Farmacéutica Bióloga. UNAM.
- Garrido H, Yunga E. 2003. Incidencia de Cáncer en Loja. Registro de Tumores. Solca-Loja. 1997-2003
- Global Cancer Facts & Figures 2007. American cancer society
- González G. Domínguez H. 2003. "Protocolo de vigilancia sanitaria específica para los/as trabajadores/as expuestos a Agentes Citostáticos", *Revista Cubana* 56: 134-149
- Goodman A. Las bases farmacológicas de la terapéutica. McGraw-Hill Interamericana. Decima edición, 2003
- Gutiérrez Z, Mantovani M, Eira A, Ribeiro L, Jordao B. 2004. Variation of the antimutagenicity effects of water extracts of *Agaricus blazei* Murrill in vitro. *Toxicology in Vitro* 18: 301-309.
- Hernández Martin A, Núñez Reiz A, Saiz Martínez M. 2006. Costa por proceso en el tratamiento quirúrgico del cáncer de piel. *Gac Sanit*, vol. 20, pp. 273-279.
- Izumi E., Morello L., Ueda-Nakamura T., Yamada S., Prado B., Garcia D., Piloto I., Morgado J., Vataru C., 2008.

- Trypanosoma cruzi: Antiprotozoal activity of parthenolide obtained from *Tanacetum parthenium* (L.) Schultz Bip. (Asteraceae, Compositae) against epimastigote and amastigote forms. *Experimental Parasitology* 118:324–330
- Itokawa H., Morris-Natschke S., Akiyama T., Lee K., 2008. Plant-derived natural product research aimed at new drug discovery. *J Nat Med* 62:263–280
 - Itharat A., Houghton P., Amooquaye E., Burke P., Sampson J., Raman A., 2004. In vitro cytotoxic activity of Thai medicinal plants used traditionally to treat cancer. *Journal of Ethnopharmacology* 90: 33- 38
 - Kintzios S., 2008. Terrestrial Plant-Derived Anticancer Agents and Plant Species Used in Anticancer Research. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 25:2, 79 – 113.
 - Kirs- Volders M., Fenech M., 2001. Inclusion of micronuclei in non-divided mononuclear lymphocytes and necrosis/apoptosis may provide a more comprehensive cytokinesis block micronucleus assay for biomonitoring purposes. *Mutagenesis*; 16: 51-58.
 - Lane Lilley L., Aucker R., Lake R., Gómez R., 1999. *Farmacología en Enfermería*. Edition: 2, illustrated. Publicado por Elsevier España, 860 ppg).
 - Mateuca R., Lombaert N., Aka P., Decordier I., Kirsch M., 2006. Chromosomal changes: induction, detection methods and applicability in human biomonitoring. *Biochimic*
 - Malagón O, 2007. Evaluación e identificación de sustancias antimicrobiales y antitumorales a partir de plantas medicinales y hongos del Sur del Ecuador. Informe Anual del Proyecto.
 - Mudry M, Carballo M. 2006 *Genética Toxicológica*. Editorial De los cuatro vientos Argentina
 - National Cancer Institute. 2008
 - Norppa H, Falck G. 2003. What do human micronuclei contain *Mutagenesis* vol.18
 - 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: 2855-2865

- Parkin DM. 2006. The global health burden of infection-associated cancers in the year 2002. *Int. J Cancer*; 118:3030-3044.
- Piloto J., Ramos A., Vizoso A., García A., 2000. Evaluación del potencial genotóxico de un extracto fluido de incienso (*Artemisia absinthium* L.). *Revista Cubana Plant Med*; 5(2):64-7.
- Philips D., Venitt S., 1995. *Environmental Mutagenesis*. BIOS Scientific Publishers Limited.
- Patiño A. 2005. The cytogenetic assay as a measure of genetic instability induced by genotoxic agents; *Anales* 28 (2): 227-236.
- Parejo I., Viladomat F., 2003. Investigation of Bolivia plant extracts for their radical scavenging activated and antioxidant activity. *Life Sciences* 73: 1667- 1681.
- Picman A., 1986. Review Article Number 7 Biological Activities of Sesquiterpene Lactones., *Biochemical Systematics and Ecology*, Vol. 14, No. 3, pp. 255-281.
- Pichette A, Garneau F., Collin G., Jean F., Gagnon H., 2005. Essential oils from Bolivia IV compositae: *Tagetes aff. maxima* Kuntze and *Tagetes multiflora* HBK. *Journal Essential Oil Research* 17: 27-28.
- Polo L., Castro C., Cruzado M., Collino C., Cuello 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. *European Journal of Pharmacology* 556: 19–26.
- Quintana S., Hoppe V., Demarchi V., Barelli C., Gosman G., Reginato S., 2005. Screening of antibacterial activity of South Brazil. *Baccharis species*. *Biology* 43 (5), 434-438
- Requena L., 2006. Estudio citotóxico de extractos de plantas medicinales del sur del Ecuador mediante el ensayo de MTS en líneas celulares cancerígenas.
- Ramos A., Rivero R., Visozo A., Piloto J., García A., 2002. Parthenin, a sesquiterpene lactone of *Parthenium hysterophorus* L. is a high toxicity clastogen; *Mutation Research* 514: 19–27.
- Roldán E., Pérez A., 2002. Evaluación de micronúcleos en cultivo de Linfocitos humanos tratados con Casiopeína

- igly; UNIGEN, UNAM, México D.F., 2º Congreso Nacional de Química Médica.
- Salazar A, Sordo M, Ostrosky P., 2009. Relationship between micronuclei formation and p53 induction. *Mutation Research* 672: 124–128.
 - Sanjeev N., Madhu K., Srikanta K., 2006. Evaluation of apigenin using in vitro cytochalasin blocked micronucleus assay. *Toxicology in vitro* 20: 1168-1172.
 - Salamia S., Karami-Tehrani F., 2003. Los estudios bioquímicos de la apoptosis inducida por tamoxifeno en el receptor de estrógeno positivo y negativo de células de cáncer de mama linesmall.
 - Skeel R, Ruppert R. 2000. *Quimioterapia del Cáncer*. Quinta ed. Editorial Marban.
 - Toledo Z, 2007. Evaluación genotóxica del extracto metanólico *Gynoxis verrucosa* Mediante ensayo de CBMN en linfocitos Humanos. Tesis de grado para la obtención del título de Bioquímico Farmacéutico.
 - Tene V, Malagón O, Vita Finzi P, Vidari G, Armijos Ch, Zaragoza T. 2006. An ethnobotanical survey of medicinal plants used in Loja and Zamora-Chinchipec, Ecuador. *Journal of Ethnopharmacology*.
 - Vintimilla A, 2007. Estudio Genotóxico De Extractos Metanólico de plantas Medicinales: *Baccharis Latifolia* y *Gynoxis verrucosa*, Mediante ensayo cometa en la línea celular CHO-K1. Tesis de grado para la obtención del título de Bioquímico Farmacéutico. UTPL.
 - Yépez J, 2006. Instituto Nacional de Tumores. Quito – Ecuador.
 - Zalacain M., Sierrasesúmaga D., Weinberg R, 2000. The Hallmarks of Cancer, Whitehend Institute for Biomedical Research and Department of Biology. 100: 57 – 70.