



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO

INSTITUTO DE CIENCIAS DE LA SALUD

**“Evaluación del efecto quimioprotector de la  
decocción de la raíz de *Jatropha dioica* en ratones  
albinos suizos cepa ICR mediante Ensayo cometa *in  
vivo*”**

Tesis que para obtener el grado de:

**MAESTRA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS Y DE LA SALUD**

Presenta:

**MARTINEZ GARCIA NELVY**

Director(a) de Tesis

**HERNANDEZ CERUELOS MA. DEL C. ALEJANDRA**

San Agustín Tlaxiaca Hgo. Febrero de 2013





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO  
 INSTITUTO DE CIENCIAS DE LA SALUD  
 MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS Y DE LA SALUD

Of. No MCBS/2012/128  
 Asunto: Asignación de Jurado de examen

Lic. Nelvy Martínez García  
 Candidata a Maestra en Ciencias Biomédicas y de la Salud

Por este conducto le comunico el jurado que le fue asignado a su Tesis titulada "Evaluación del efecto quimioprotector de la decocción de la raíz de la *Jatropha dioica* en ratones albinos suizos cepa ICR mediante Ensayo cometa *in vivo*", con el cual obtendrá el Grado de Maestra en Ciencias Biomédicas y de la Salud; después de revisar la tesis mencionada y haber realizado las correcciones acordadas, han decidido autorizar la impresión de la misma.

A continuación se anotan las firmas de conformidad de los integrantes del jurado:

- PRESIDENTE DRA. MARÍA DEL CARMEN ALEJANDRA HERNÁNDEZ CERUELOS
- PRIMER VOCAL MTRA. GEORGINA ALMAGUER VARGAS
- SECRETARIO DRA. ANA HILDA FIGUEROA GUTIÉRREZ
- SUPLENTE DRA. CLARA ZUÑIGA PÉREZ
- SUPLENTE DR. JUAN ELIEZER ZAMARRIPA CALDERÓN

Sin otro asunto en particular, reitero a usted la seguridad de mi atenta consideración.



Atentamente  
 "AMOR, ORDEN Y PROGRESO"  
 San Agustín Tlaxiaca Hgo. a 30 de noviembre de 2012

M.C. ESP. JOSÉ MARÍA BUSTO VILLARREAL  
 DIRECTOR

M.C. ESP. MARICELA GUEVARA CABRERA  
 COORDINADORA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO ICSA

DR. JUAN ELIEZER ZAMARRIPA CALDERÓN  
 COORDINADOR DEL PROGRAMA

Laboratorio de Materiales Dentales /Clínica de Odontología Ciudad del Conocimiento carretera Pachuca Tulancingo Km. 4.5  
 Mineral de la Reforma Hgo. C.P. 42184 Tel: (771) 7172000 ext. 6991 correo electrónico mtria\_bio\_sal@uaeh.edu.mx



Durante el desarrollo de estos estudios, se contó con una beca de manutención otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), número de beca 377224.

## **Dedicatorias y agradecimientos**

*“Nunca consideres el estudio como una obligación, sino como una oportunidad para penetrar en el bello y maravilloso mundo del saber.”*

*“Hay una fuerza motriz más poderosa que el vapor, la electricidad y la energía atómica: la voluntad.”*

*Albert Einstein*

El deseo de penetrar en el bello y maravilloso mundo del saber es el motor que rige mi vida, puede ser instintivo, pero sé que también ha sido aprendido, y bien nutrido por la voluntad y constancia de mis padres Isidoro Martínez Lorenzo y Ma. Remedios García Fierros, excelentes maestros en el aula y la casa, a ustedes les agradezco la vida, el cariño, el cuidado y la educación que me han brindado, los valores inculcados son los que me han permitido culminar un objetivo más en mi desarrollo profesional.

La inquietud de comenzar este proyecto, no solo se debe a intereses personales, también debo agradecerle el impulso, la confianza y el apoyo moral y económico de mi compañero de vida Mario Hernández Porras, gracias por creer en mi capacidad y por estar a mi lado respaldando cada paso que doy.

Agradezco la oportunidad y la confianza de todo el personal directivo y académico de la Maestría en Ciencias Biomédicas y de la Salud de la UAEH.

La presente tesis es resultado de las enseñanzas de mi tutora, la Dra. Alejandra Hernández Ceruelos, a quien le agradezco el haber compartido su experiencia en la investigación conmigo, sin duda todo trabajo requiere de un gran esfuerzo, y la disposición que tuvo a bien de culminar este proyecto, tenga la seguridad que lo agradezco infinitamente.

Agradezco también la camaradería de mis dos grandes amigos y compañeros Fabiola González Castelazo y Javier Hernández Romero, a quien les estaré eternamente agradecida

por su disposición, apoyo, amistad que me han brindado, son el mayor tesoro que me llevo de la Maestría, su personalidad los hace, seres llenos de luz, extraordinarios seres humanos, este trabajo no solo está dedicado a ustedes, en él también está reflejado su trabajo y esfuerzo para la realización de este proyecto.

Con toda la voluntad he logrado culminar el objetivo planteado, y lo dedico con todo mi amor y cariño a Monserrat y a Yaretzi Hernández Martínez, mis hijas preciosas que son el motor de mi vida, estoy consciente que han sido muchas horas de ausencia y abandono que han pasado, sé que las dos son quien más han padecido mi ausencia, es por ello que este logró es dedicado absolutamente para ustedes y tengan la seguridad de que este esfuerzo valdrá la pena, pues en mí siempre encontraran un apoyo y cariño incondicional, este tiempo sirvió para refrendarme que son ustedes lo más importante.

## ÍNDICE GENERAL

i

## ÍNDICE DE FIGURAS

i

Figura 1. Esquema simplificado de las rutas de biosíntesis de metabolitos secundarios y sus interrelaciones con el metabolismo primario	13
Figura 2. Formación de precursores de terpenos	14
Figura 3. Esquema de la biosíntesis de fenoles a partir de la fenilalanina.	19
Figura 4. <i>Jatropha dioica</i>	28
Figura 5. Mapa de distribución de <i>J. dioica</i> en México	29
Figura 6. Estructura química del riolozatriona.	33
Figura 7. Estructura química de jatrofatriona y citlalitriona.	33
Figura 8. Clasificación de agentes antimutagénicos y mecanismo de acción	39
Figura 9. Vía de activación metabólica de la CF	42
Figura 10. Alquilación del DNA por MMS.	47
Figura 11. Manejo de ratones albinos suizos cepa ICR.	54
Figura 12. Área de recolección de la <i>Jatropha dioica</i> . Coordenadas +20° 10' 23.51", -99° 16' 40.35"	55
Figura 13 Diagrama de metodología del Ensayo cometa.	61
Figura 14. Clasificación de la morfología de los núcleos en el ensayo del cometa	63
Figura 15. Diagrama de obtención y preparación del material vegetal.	64
Gráfica 1. Momento de la cola de células de hígado tratadas con CF.	63
Gráfica 2. Longitud de cola de células de hígado tratadas con CF.	63
Gráfica 3. Momento de la cola de células de riñón tratadas con CF	65
Gráfica 4. Longitud de la cola de células de riñón tratadas con CF	65
Gráfica 5. Momento de la cola de células de médula ósea tratadas con CF.	67
Gráfica 6. Longitud de la cola de células de médula ósea tratadas con CF.	67
Gráfica 7. Momento de la cola de células de hígado tratadas con DAUNO	69
Gráfica 8. Longitud de la cola de células de hígado tratadas con DAUNO	69
Gráfica 9. Momento de la cola de células de riñón tratadas con DAUNO	71
Gráfica 10. Longitud de la cola de células de riñón tratadas con DAUNO	71
Gráfica 11. Momento de la cola de células de médula ósea tratadas con DAUNO	73
Gráfica 12. Longitud de la cola de células de médula ósea tratadas con DAUNO	73
Gráfica 13. Momento de la cola de células de hígado tratadas con MMS	75
Gráfica 20. Longitud de la cola de células de hígado tratadas con MMS	75
Gráfica 15. Momento de la cola de células de riñón tratadas con MMS	77
Gráfica 16. Longitud de la cola de células de riñón tratadas con MMS	77
Gráfica 17. Momento de la cola de células de médula ósea tratadas con MMS	79
Gráfica 18. Longitud de la cola de células de médula ósea tratadas con MMS	79

<b>ÍNDICE DE TABLAS</b>	<i>ii</i>
Tabla 1: Uso de <i>Jatropha dioica</i> en la MT Mexicana	31
Tabla 2. Distribución de grupos de experimentación	57
Tabla 3. Índice de daño de células del hígado tratadas con CF	64
Tabla 4. Índice de daño de células del riñón tratadas con CF	66
Tabla 5. Índice de daño de células de médula ósea tratadas con CF	68
Tabla 6. Índice de daño de células de hígado tratadas con DAUNO	70
Tabla 7. Índice de daño de células de riñón tratadas con DAUNO.	72
Tabla 8. Índice de daño de células de médula ósea tratadas con DAUNO.	74
Tabla 9. Índice de daño de células de hígado tratadas con MMS.	76
Tabla 10. Índice de daño de células de riñón tratadas con MMS	78
Tabla 11. Índice de daño de células de médula ósea tratadas con MMS.	80
<b>ABREVIATURAS</b>	<i>iv</i>
<b>RESUMEN</b>	1
<b>ABSTRACT</b>	4
<b>I INTRODUCCIÓN</b>	6
<b>II ANTECEDENTES</b>	9
2.1 Medicina Tradicional (MT)	9
2.2 Agentes fitoquímicos	12
2.2.1 Clasificación de los metabolitos secundarios	13
2.2.2 Terpenos	14
2.2.3 Compuestos fenólicos	18
2.2.4 Compuestos que contienen nitrógeno	22
2.3 Familia Euphorbiaceae	23
2.3.1 Genero <i>Jatropha</i>	23
2.3.2 Usos terapéuticos de especies del genero <i>Jatropha</i>	25
2.4 <i>Jatropha dioica</i> Cerv.	28
2.4.1 Descripción botánica	28
2.4.2 Hábitat	29
2.4.3 Usos medicinales	30
2.4.4 Fitoquímicos de la <i>J. dioica</i>	33
2.5 Quimioprotección	36
2.6 Agentes genotóxicos	40
2.6.1 Ciclofosfamida (CF)	41
2.6.2 Daunorrubicina (DAUNO)	44
2.6.3 Metilmetanosulfonato (MMS)	46
2.7 Ensayo cometa (SCGE)	48

<b>III</b>	<b>JUSTIFICACIÓN</b>	51
<b>IV</b>	<b>HIPÓTESIS</b>	52
<b>V</b>	<b>OBJETIVOS</b>	52
5.1	Objetivo General	52
5.2	Objetivos Específicos	52
<b>VI</b>	<b>MATERIAL Y MÉTODO</b>	53
6.1	Sustancias químicas	
6.1.1.	CF	
6.1.2	DAUNO	53
6.1.3	MMS	
6.2	Animales	54
6.3	Material vegetal y preparación de la decocción	55
6.4	Diseño experimental	56
6.5	Ensayo cometa	
6.5.1	Reactivos	58
6.5.2	Preparación para las muestras del EC	58
6.5.3	Evaluación del daño del DNA	62
6.6	Análisis estadístico	63
<b>VII</b>	<b>RESULTADOS</b>	64
7.1	Obtención de la raíz de <i>Jatropha dioica</i>	64
7.2	Ensayo cometa	
7.2.1	Efecto de la decocción mediante la inducción de daño con CF	65
7.2.2	Efecto de la decocción mediante la inducción de daño con DAUNO	71
7.2.3	Efecto de la decocción mediante la inducción de daño con MMS	77
<b>VIII</b>	<b>DISCUSIÓN DE RESULTADOS</b>	83
8.1	Efecto quimioprotector ante el daño genotóxico con CF	84
8.2	Efecto quimioprotector ante el daño genotóxico con DAUNO	88
8.3	Efecto quimioprotector ante el daño genotóxico con MMS	91
<b>IX</b>	<b>CONCLUSIONES</b>	97
<b>X</b>	<b>RECOMENDACIONES</b>	100
<b>XI</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	101
<b>XII</b>	<b>ANEXOS</b>	111
11.2	Bitácora de registro de peso de ratones	112
11.3	Bitácora de corrimiento electroforético	113
11.4	Bitácora de lectura de muestras en microscopio	114
<b>XII</b>	<b>GLOSARIO DE TÉRMINOS</b>	116

## ABREVIATURAS

<i>Jatropha dioica</i>	<i>J. dioica</i>
10E-geranilgeranilpirofosfato	GGPP
2-mercaptoetilamina	MEA
Acetil coenzima A	Acetil-CoA
Ácido cianhídrico	HCN
Ácido desoxirribonucleico	DNA
Ácido elágico	EA
Ácido ribonucleico	RNA
Adenosin trifosfato	ATP
Agarosa de bajo punto de fusión	LMPA
Agarosa de normal	NMA
Alineamiento de cadenas sencillas	ACS
Antígeno nuclear de proliferación de celular	PCNA
Butilhidroxianisol	BHA
Butilhidroxitolueno	BHT
Capacidad de reducción férrica en Plasma	FRAP
Carbono	C
Centro de Investigaciones Biológicas de la UAEH	CIB-UAEH
Ciclofosfamida	CF
Citocromo P	CYP
Ciudad	Cd.
Comisión Nacional para el Desarrollo de los pueblos Indígenas	CDI
Cortes en cadena doble	CCD
Daunorrubicina	DAUNO
Decocción de la <i>J. Dioica</i>	DJD
Dosis de decocción alta	DDA
Dosis de decocción baja	DDB
Dosis de decocción media	DDM
Dosis letal 50	DL <sub>50</sub>

Ensayo cometa o electroforesis en gel de células individuales	SCGE
Especies	spp
Especies reactivas de oxígeno	ROS
Estados Unidos	E. U.
Frecuencia de micronúcleos en eritrocitos policromáticos	MNPCEs
Geranilpirofosfato	GPP
Hidalgo	Hgo.
Índice de daño	ID
Instituto de Ciencias de la Salud	ICSa
Instituto de Ecología y Botánica	IEB
Instituto Mexicano para el Seguro Social	IMSS
Instituto Nacional Indigenista	INI
Intervalo de confianza	IC
Jatrofina	$C_{14}H_{20}O_6N$
Longitud de cola	TL
Medicina tradicional	MT
Medicina tradicional indígena mexicana	MTIM
Metanol	MeOH
Metilmetanosulfonato	MMS
Micronúcleos	MN
Momento de la cola	TM
Noroeste	NE
Objetivo de la rapamicina	TOR
Organización Mundial de la Salud	OMS
Pirofosfato de dimetilalilo	DMAPP
Pirofosfato de isopentenilo	IPP
Politerpenoides	$[C_5]_n$ si $n > 8$
Potencial de Hidrógeno	pH
Proteína 53	p 53
Recombinación homóloga	RH
Respuestas al daño del DNA	DDR

Secretaria de Salud	SSa
Síndrome de Inmuno deficiencia adquirida	SIDA
Ultravioletas	UV
Unión de cadenas sin homología	UCSH
Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo	UAEH
Universidad Nacional Autónoma de México	UNAM
Vía intraperitoneal	v. i. p.
Vía oral	v. o.

#### Unidades de medida

Centímetros	cm
Gramos	g
Kilogramos	Kg
Metros	m
Micro litros	$\mu$ l
Micrómetros	$\mu$ m
Mili amperes	mA
Miligramos	mg
Milímetros	mm
Minutos	min
Unidades arbitrarias	u.a.
Voltios	V

## RESUMEN

En este estudio se evaluó el efecto quimioprotector de la decocción de la raíz de la *Jatropha dioica* (*J. dioica*), en células hepáticas, renales y de medula ósea, mediante el Ensayo cometa (SCGE) versión alcalina, utilizando ratones albinos suizos cepa ICR (*Mus musculus*) como biomodelo experimental. Se utilizaron tres agentes mutagénicos con mecanismos de acción perfectamente bien definidos, con la finalidad de conocer el mecanismo de acción de la decocción. Se formaron 6 grupos experimentales, el primer grupo testigo negativo administrado con agua purificada marca e-pura vía oral (v. o.), el segundo como control positivo 1, administrado con 50mg/kg de Ciclofosfamida (CF), 10mg/kg de Daunorrubicina (DAUNO) o 40mg/kg de Metilmetanosulfonato (MMS), vía intraperitoneal (v. i. p.), el tercero como control positivo 2 administrado con la decocción de la *J. dioica* (DJD) a dosis de 21.42ml/kg, el cuarto, quinto y sexto como grupos de tratamiento o experimentación a los que se les administro el agente mutagénico v. ip., en su dosis correspondiente y posteriormente la dosis de la decocción, al grupo experimental 1 se le administró 14.88mg/kg, dosis de decocción baja (DDB), al grupo experimental 2, 42.84mg/kg, dosis de decocción media (DDM) y al grupo experimental 3, 85.68mg/kg dosis de decocción alta (DDA) v.o.

De acuerdo con los resultados obtenidos la DJD, demostró tener efecto quimioprotector contra daño inducido por CF, en células de hígado, a partir de las 3 horas del tratamiento con las tres dosis, pero el mayor efecto se observó con la DDA, de acuerdo al Momento de la cola (TM) y Longitud de cola (TL), efecto que se mantiene hasta las 21 horas donde los valores de todos los grupos son cercanos al testigo negativo. En células del riñón no se observó efecto quimioprotector con ninguna dosis en ningún horario, al contrario se observó un incremento en las rupturas del DNA con la CF como era de esperarse y con la DDM a las 3 horas de su administración que se mantienen altos en los demás horarios, incluso el grupo de control 2, tratado solo con la DJD, mostró tener efecto genotóxico a las 21 horas de su administración. En células de medula ósea, la DDM y la DDA, mostraron

efecto quimioprotector a las 3 horas de su administración que se potencio a las 9 horas con las tres dosis, sin embargo a las 15 y 12 horas el efecto no es claramente demostrado, solo la DDA mostro valores cercanos al testigo negativo a las 21 horas. En este órgano la CF mostro su efecto genotóxico esperado desde las 3 horas hasta las 15 horas, los grupos tratados con la DDB y DDM obtuvieron valores más altos para TM y TL que incluso la propia CF, sin ser estadísticamente significativos.

En los grupos tratados con DAUNO, se observó un efecto genotóxico esperado por la administración del mutágeno, también mostraron efecto genotóxico la DDM y la DDB de las 3 a las 15 horas después del tratamiento, el efecto quimioprotector en las células del hígado se observó la DDA de la DJD, desde las 3 horas hasta las 21 horas posterior a su administración, lo que sugiere que el efecto es dependiente de la dosis. En células del riñón el efecto quimioprotector se observó con las tres dosis de la DJD en todos los horarios, siendo clara reducción de rupturas en el DNA a las 21 horas con las tres dosis, el efecto genotóxico inducido por la DAUNO se observó a partir de las 3 horas y hasta las 21 horas, en este ultimo la DJD mostro efecto genotóxico. En células de medula ósea también se observó un efecto quimioprotector con las tres dosis pero en mayor proporción con la DDA y la DAUNO tuvo efecto genotóxico desde las 3 hasta las 9 horas, y nuevamente la DJD tuvo efecto genotóxico en este grupo de células evidente a las 21 horas.

La DJD mostro tener efecto quimioprotector contra daño inducido por MMS en células del hígado, con las tres dosis de la DJD a partir de las 3 horas hasta las 21 horas con la DDA, por lo que el efecto es dependiente de la dosis, sin embargo el grado de daño en los tres grupos de experimentación a pesar de ser menor que el daño inducido por el MMS, comparado contra el testigo negativo el incremento de las rupturas del DNA es mayor estadísticamente significativo por lo que el efecto de la DJD no es eficientemente quimioprotector. En células del riñón se observó el efecto quimioprotector a las 3 horas con las tres dosis de la DJD y a las 9 horas con la DDA y DDM, nuevamente efecto no muy eficiente pues los valores del MMS y de las tres dosis de la DJD mostraron efecto

genotóxico en comparación con el testigo negativo en todos los horarios. En médula ósea se observó un efecto quimioprotector con la DDB a las 3 horas de su administración, sin embargo en el transcurso de los horarios esta misma dosis incremento las rupturas en el DNA, mostrando daño genotóxico a las 21 horas al igual que las otras dosis de la DJD.

Es posible que el efecto quimioprotector observado en células del hígado, evaluado con los tres mutágenos, se deba a la propia naturaleza de las células, es decir a su capacidad para metabolizar xenobióticos mediante procesos de biotransformación de Fase I, y contenido de enzimas microsomales como la familia del Citocromo P450.

El mayor efecto quimioprotector se observó en todos los órganos de ratones a los que se les indujo daño genotóxico con la DAUNO, sobre todo con la DDA, lo que sugiere un efecto dependiente de la dosis, atribuido los compuestos fitoquímicos de la DJD y su posible efecto antioxidante.

## ABSTRACT

This study evaluated the chemopreventive effect of the decoction of the root of *Jatropha dioica* (*J. dioica*), in liver cells, kidney and bone marrow, by alkaline comet assay version, using strain ICR Swiss albino mice (*Mus musculus*) as experimental biomodel. We used three mutagenic agents with mechanisms of action perfectly well defined, in order to understand the mechanism of the decoction. 6 experimental groups were formed, the first negative control group administered with purified water pure brand e-orally (v. o.), the second one as a positive control, administered with 50mg/kg of Cyclophosphamide (CF), 10mg/kg of Daunorubicin (DAUNO) or 40mg/kg of Metilmetanosulfonato (MMS), intraperitoneal (v. ip.), the third as a positive control 2 administered with the decoction of the *J. dioica* (DJD) at doses of 21.42ml/kg, fourth, fifth and sixth like or experimental treatment groups to which were administered the v. ip. mutagenic agent, where appropriate dose and subsequent dose decoction, the experimental group 1 was given 14.88mg/ kg dose of decoction low (DDB), the experimental group 2, 42.84mg / kg dose of half decoction (DDM) and the experimental group 3, 85.68mg / kg dose of high decoction (DDA ) v. o.

According to the results of the root decoction of *J. dioica*, demonstrated chemopreventive effect against CF induced damage in liver cells strain ICR Swiss albino mice, after 3 hours of treatment with the three doses, but the greatest effect was observed with the DDA, according to the time moment (TM) and tail length (TL), an effect that is maintained until 21 hours where the values of all groups are close to the negative control. In kidney cells chemopreventive effect was not observed at any dose at any time, the opposite was observed an increase in DNA breaks with CF as expected and with the DDM at 3 hours after administration and remained high in other times, even the control group 2, treated only with high dose decoction, was shown to have genotoxic effect at 21 hours after administration. In bone marrow cells, the DDM and the DDA, showed chemopreventive effect at 3 hours after administration which was enhanced at 9 am with the three doses, but at 15 and 12 hours, the effect is not clearly shown, only the DDA showed values close to the negative control at 21 hours. In this body the CF showed genotoxic effect expected from 3 hours to 15 hours, the groups treated with DDB and DDM obtained higher values for TM and TL even CF itself, not statistically significant.

In DAUNO treated groups, there was a genotoxic effect expected by the administration of mutagenic, genotoxic effect also exhibited the DDM and DDB of 3 to 15 hours after treatment, the chemopreventive effect in liver cells was observed the DJD of DDA, from 3 hours to 21 hours after its administration, suggesting that the effect is dose dependent. In kidney cells chemopreventive effect was observed with all three doses of DJD at all times, being clear reduction in DNA breaks at 21 am with the three doses, induced genotoxic effect was observed from 3 hours and up to 21 hours, in the latter the DJD showed genotoxic effect. In bone marrow cells also chemopreventive effect was observed with all three doses but to a greater extent with the DDA and had genotoxic effect from 3 until 9 pm, and again had DJD genotoxic effect in this group of cells evident 21 hours.

DJD have showed the chemopreventive effect against injury induced by MMS in liver cells, with the three doses of DJD from 3 hours to 21 hours with the DAA, so that the effect is dose dependent, however the degree of damage in the three experimental groups despite being less than the MMS induced damage compared to the negative control increased DNA breaks is greater statistically significant as the effect is not efficiently DJD chemopreventive. In kidney cells chemopreventive effect was observed at 3 hours with three doses of DJD and 9 hours with the DDA and DDM, again not very efficient effect for MMS and values of the three doses of the effect showed DJD genotoxic compared with the negative control at all times. In bone marrow chemopreventive effect was observed with DDB at 3 hours after administration, but during this same dose time's increase in DNA breaks, showing genotoxic damage at 21 hours as other dose of DJD.

It is possible that the chemopreventive effect observed in liver cells, evaluated with three mutagenic due to the nature of the cells, i.e. their ability to metabolize xenobiotic by biotransformation processes Phase I and microsomal enzyme content as Cytochrome P450 family. The greatest effect was observed chemopreventive in all organs of mice that were induced with genotoxic damage, especially with the DDA, suggesting a dose-dependent effect, attributed the phytochemical compounds and their possible DJD antioxidant effect.

## I. INTRODUCCIÓN

El hombre está cada vez más expuesto a los agentes mutagénicos, que dañan al Ácido Desoxirribonucleico (DNA), portador de la información genética, ocasionando el desarrollo de algunas enfermedades de tipo crónico-degenerativas, como la Diabetes Mellitus, enfermedades cardiovasculares y cáncer.[10] Las células tienen la capacidad de reparar dichas lesiones mediante la acción de respuestas al daño del DNA. Uno de estos mecanismos incluye la quimioprotección, (Sporn, 1976) definida como, “la potenciación farmacológica o fisiológica, mediante las cuales la progresión de una lesión preneoplásica puede ser prevenida, detenida o revertida”.[11]

Existen varios agentes quimiopreventivos que operan mediante múltiples mecanismos, con una alta eficacia y un amplio espectro de acción.[12] Las plantas vasculares contienen muchos constituyentes químicos vegetales o fitoquímicos potenciales, útiles para la quimioprotección, se sabe que desde el inicio de la humanidad, las plantas han sido utilizadas como alimento y en la Medicina Tradicional, práctica habitual, que representa cerca del 79% en la población mundial, por sus propiedades beneficiosas para la salud.[13]

Algunas especies de la Familia de las *Euphorbiaceae*,[14] específicamente del género *Jatropha* cuyo nombre proviene de los vocablos griegos *Jatros* (doctor) y *Trophe* (Alimento), del cual se conocen más de 175 especies, son utilizadas en la Medicina Tradicional en varios países como: la India, África, Portugal y México.[15] Algunos estudios han reportado la presencia de metabolitos secundarios en las plantas de este género como: alcaloides, terpenos (diterpenos, triterpenos) lignanos, péptidos cíclicos, [16] flavonoides, y fitoesteroles, [17] asociados con actividades biológicas como antiinflamatoria, antimicrobianos, [18] antitumoral, citotóxica [19] así como promotor de la actividad tumoral.[20]

En México existe un gran acervo de plantas consideradas medicinales, una de ellas pertenece al género antes mencionado, la *Jatropha dioica* o Sangre de Drago. Arbusto aproximadamente 70 cm de altura, con tallos oscuros, lisos, correosos, fibrosos, flexibles, tienen savia clara astringente, que al contacto con el ambiente, se torna rojizo (látex rojizo), las hojas son fasciculadas lineales a espatuladas, a veces lobuladas de 1-7cm, flores blancas con rosa muy pequeñas presentes en época de lluvia y frutos con semilla negra muy globosa de 8-10mm.[21]

En México, habita en matorrales xerófilos del Noroeste (NE) hasta el centro del país, en laderas de los cerros, en el plano, en tepetate y en suelo pedregoso en un rango de altitud de 5-2800 m.[22] En el Estado de Hidalgo se localiza en el Valle del Mezquital, en el municipio de Ixmiquilpan (Dexthi, Cantamaye, Orizabita, Puerto Dexthi y San Juanico) en donde se elabora un champú para uso humano a base de Sangre de grado[23], el Cardonal (San Antonio Sabanillas y Cardonal), Tezontepec de Aldama, Chilcuautla (Tunititlán) y en Meztitlán (Barranca).[15, 24] Otros Estados en los que se ha reportado su presencia son: Estado de México, Durango (San Juan Mogote), Zacatecas, Chihuahua (Desierto)[25-27], San Luis Potosí (Real de Catorce), [28] Tamaulipas. [29]. La planta se obtiene por recolección y se encuentra disponible durante todo el año en el Mercado de Sonora de la Cd. De México. [30]

Se le considera a la Sangre de Drago una planta medicinal fría o fresca, relatada en el siglo XX como: anti disentérica, antiescorbútica, antiséptica, astringente, para la dermatosis, hemorroides, piorrea (encías) y como tónico capilar; de aplicación externa o como infusión para el tratamiento de: Caída del cabello, contra la caspa y orzuela, dolor de dientes, amacizar la dentadura, para quitar callos, sacar espinas, parar hemorragias, cicatrizar heridas, quitar granitos, salpullido, lavar heridas, dolor de riñones, espalda y corazón, problemas de digestión “empacho”, debilidad por reumas, várices, dolor de piernas y cáncer.[31-34]

Se le han identificado tres diterpenos:

- Citlaltiriona: Ha mostrado una notable actividad inhibidora de tumores. [35]
- Jatrolone  $\beta$ : Se le ha observado efecto gastroprotector [36]
- $\beta$ -Jatrolona: Efecto antitumoral [37]
- Rioloatriona:

Un esteral:  $\beta$ -sitosterol, con actividad quimioprotectora conocida al inhibir el crecimiento de líneas celulares de cáncer de colon, al inducir la apoptosis por barrido de especies reactivas de oxígeno (SRO) y suprimir la expresión de  $\beta$ -catenina y antígeno nuclear de proliferación de celular (PCNA) [38]. De la raíz se obtiene un aceite esencial, resina, saponinas, un alcaloide y ácido oxálico que posee actividad fuerte contra *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*. De los tallos emana un látex rico en taninos con actividad antibiótica contra *Staphylococcus aureus*. [39, 40]

El Ensayo cometa o electroforesis en gel de células individuales (SCGE), es un ensayo rápido, sensible y un método relativamente simple para detectar daños en el DNA a nivel de células individuales. Combina la simplicidad de técnicas bioquímicas para detectar roturas en la cadena del DNA sencillas y sitios de reparación de escisión incompleta, sitios alcalilábiles y entrecruzamiento con el enfoque de células individuales de pruebas citogenéticas. La versión alcalina *in vivo* (pH>13) del SCGE detecta un amplio espectro del daño al DNA y se puede aplicar en una gran variedad de tejidos de roedores, tras la administración de agentes de prueba.[41] El uso de la prueba de micro núcleos (MN) en combinación con la prueba de SCGE es una prueba prometedora para proporcionar más evaluaciones completas del potencial genotóxico. Incluso el Programa Nacional de Toxicología está utilizando este protocolo combinado para la evaluación global de la genotoxicidad de sustancias relevantes para el uso en la Salud Pública.[42]

## II. ANTECEDENTES

### 2.1 Medicina Tradicional (MT)

La Organización Mundial de la Salud (OMS) define a la MT como la suma completa de conocimientos, técnicas y prácticas fundamentadas en teorías, creencias y experiencias propias de diferentes culturas utilizadas para mantener la salud, prevenir, diagnosticar, mejorar y tratar trastornos físicos y mentales. También se le llama medicina alternativa o complementaria cuando ha sido adoptada por otras poblaciones [43].

Los medicamentos derivados de plantas han jugado un papel fundamental en el cuidado de la salud de muchas culturas, tanto antiguas como modernas. El sistema indio de medicina holística conocido como “*ayurveda*” utiliza drogas a base de plantas o formulaciones para el tratamiento de dolencias como el cáncer[44]. Aproximadamente el 61% de los fármacos sintéticos, se originaron de productos naturales. [45]

La MT se utiliza desde hace miles de años, a partir del decenio de 1990, se ha observado un resurgimiento de su utilización en muchos países desarrollados y en vías desarrollo, en Asia y África. Se estima que aproximadamente el 80% de la población de las economías en desarrollo dependen principalmente de productos naturales para satisfacer sus necesidades de salud. [46]

Para la atención primaria, la más lucrativa es la medicina herbolaria, entendida como la que utiliza hiervas o materiales herbarios, preparaciones y productos herbarios acabados cuyos ingredientes activos son metabolitos secundarios de partes de plantas o materias vegetales, que utilizan como defensa natural contra la enfermedad y la infección, que generan millones de dólares de ingresos. [47] Con ellas se pueden tratar diversas infecciones y enfermedades crónicas, incluso se han obtenido nuevos fármacos de plantas como el antipalúdico artemisinina extraído de la *Artemisia annua* L[48].

La MT puede provocar reacciones dañinas o adversas cuando el producto o tratamiento en cuestión es de mala calidad, se toma de forma inadecuada o de manera simultánea con otros medicamentos; desafortunadamente los datos de ensayos científicos que evalúen la seguridad y eficacia de los productos y prácticas de la MT son escasas. Evaluar la calidad de productos herbarios es difícil porque su seguridad y eficacia dependen de muchos factores entre ellos: las materias de origen y la manipulación en procesos productivos. Por otro lado es necesario preservar las poblaciones de plantas así como el conocimiento sobre sus usos con fines medicinales para perpetuar la MT. [49]

Recientemente se ha propuesto como una posibilidad el uso de productos basados en plantas naturales para sensibilizar a los tumores a los fármacos quimioterapéuticos existentes. Las drogas de origen vegetal pueden ser más adecuadas, bioquímicamente para el uso medicinal humano. De hecho, muchos productos evaluados experimentalmente no se han encontrado que sean tóxicos o tienen sus dosis efectivas por debajo de sus dosis tóxicas. Los más utilizados son los polifenoles por sus propiedades antioxidantes, quimioprotectoras, quimiosensibilizadoras, radiosensibilizadoras y radioprotectoras. [44]

Desafortunadamente la medicina moderna no alienta el uso de productos naturales; en Estados Unidos (E.U.) uno de cada tres pacientes y el 50% de pacientes con Cáncer utiliza productos naturales medicinales todos los días [15, 50, 51]

En México se conoce a la MT indígena mexicana (MTIM) como el conjunto de sistemas de atención a la salud que tiene sus raíces de diferentes pueblos indígenas y rurales del país; también ha incorporado elementos de la medicina antigua española, africana y occidental. Comprende al universo como totalidad interconectada, al cuerpo humano como mente y espíritu, las causas de la enfermedad como mecanismos que rompen el equilibrio frío-calor del cuerpo, derivados del ambiente, sus procedimientos preventivos se enfocan a la exclusión y control de factores desequilibrantes, sus elementos terapéuticos incluyen: la

herbolaria, uso de productos animales y minerales, además de masajes, punciones uso de frío y calor, limpias, ensalmos y diversos ritos.[52]

La MTIM ha interactuando con otros modelos terapéuticos para conformar lo que se llama el “sistema real de salud” de millones de mexicanos del siglo XXI, habitantes del campo y la ciudad. Asociada fuertemente a las plantas medicinales, es mucho más que botánica medicinal contenida en la Biblioteca de la MT Mexicana del Instituto Nacional Indigenista de la UNAM [40].

Está reconocida en la Constitución Política en el Artículo 2 como un derecho de los pueblos indígenas a “preservar todos los elementos que les brinden su identidad cultural y aprovechar debidamente la MT”. Sin embargo se pretende lograr su reconocimiento y marco jurídico adecuado para el desarrollo en coordinación con las instituciones de salud como la Comisión Nacional para el Desarrollo de los pueblos Indígenas (CDI), el Instituto Mexicano para el Seguro Social (IMSS) así como en la Secretaria de Salud (SSa). [52]

La MT está reglamentada en más de 100 países, la OMS y sus Estados Miembros colaboran para promover el uso de la MT en atención a la salud mediante su integración a los Sistemas de Salud en combinación con políticas y reglamentos nacionales, para garantizar que las prácticas y los productos sean seguros y eficaces y de calidad con argumento de los datos científicos existentes.[43]

## 2.2 Agentes fitoquímicos

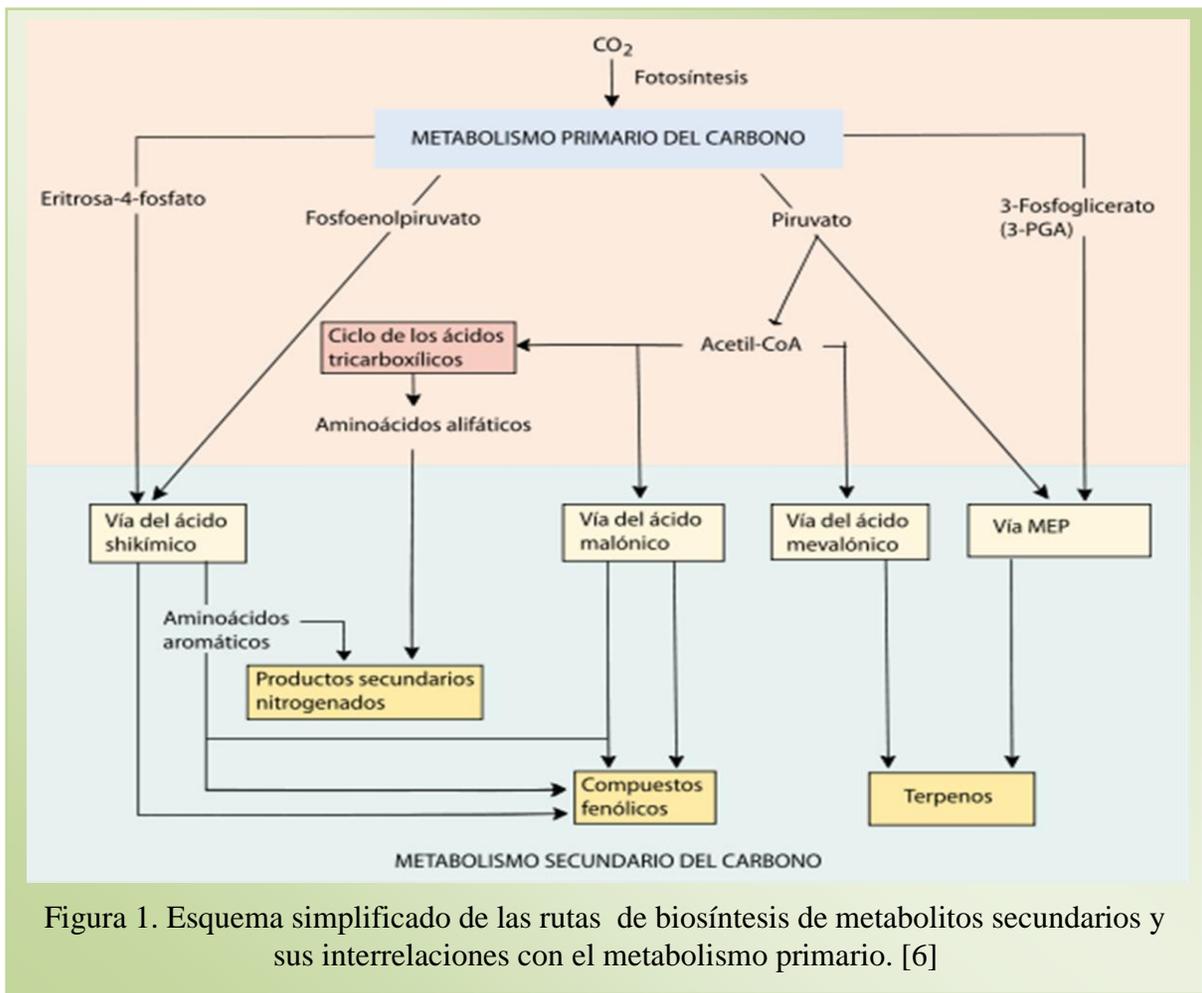
Los fitoquímicos, son compuestos bioactivos, metabolitos secundarios, carentes de valor nutritivo, sintetizados de manera natural, como mecanismo de defensa ante la ingestión de herbívoros como artrópodos, insectos y microorganismos; también le ayudan a preservar su integridad con la exposición continua a estresores ambientales, como la radiación ultravioleta, las altas temperaturas o la deshidratación y sirven como atrayentes de polinizadores y dispensadores de semillas y como agentes en la competencia planta-planta [6, 53].

Es precisamente que a estos fitoquímicos se deben las propiedades medicinales de las plantas, están presentes en las frutas, vegetales y cereales, se han identificado más de 5.000 fitoquímicos. Han sido asociados con propiedades protectoras, como anticarcinogénicas y antimutagénicas, siendo una opción importante como agentes quimioprotectores para prevenir el cáncer y de las enfermedades cardiovasculares [13, 54, 55, 56].

El proceso de extracción de metabolitos secundarios a partir de extractos de plantas es variable, se pueden obtener como extractos acuosos o polvos utilizando diferentes solventes, dependiendo de su polaridad. Se considera que estos compuestos obtenidos de plantas son biodegradables y seguros para su uso como una alternativa para el control de la enfermedad en un sistema de producción tradicional. [57]

### 2.2.1 Clasificación de los metabolitos secundarios

Los metabolitos secundarios comenzaron a estudiarse en el siglo XIX y XX, llamándolos “productos naturales”, debido a su importancia como drogas, venenos, sabores y materias industriales. Se pueden dividir en tres grupos químicamente diferentes: Los terpenos, fenoles y compuestos con nitrógeno, en la Figura 1 se muestra un esquema de las rutas metabólicas de biosíntesis de metabolitos secundarios.[6]



### 2.2.2 Terpenos

También llamados *terpenoides* o *isoprenoides*, es el mayor grupo de productos secundarios, generalmente son insolubles en agua y biosintetizados a partir del Acetil coenzima A (Acetil-CoA) o de intermediarios glicolíticos. Derivan de la unión de elementos de 5 carbonos (C), sus elementos estructurales básicos se conocen como unidades de isopreno. Se clasifican por el número en su esqueleto hidrocarbonado de unidades de C<sub>5</sub> 1, 2, 3, 4, 5, 6 ó 8 en hemiterpenos, monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos, triterpenos y tetraterpenos, respectivamente y politerpenoides ([C<sub>5</sub>]<sub>n</sub> si n>8).[6]

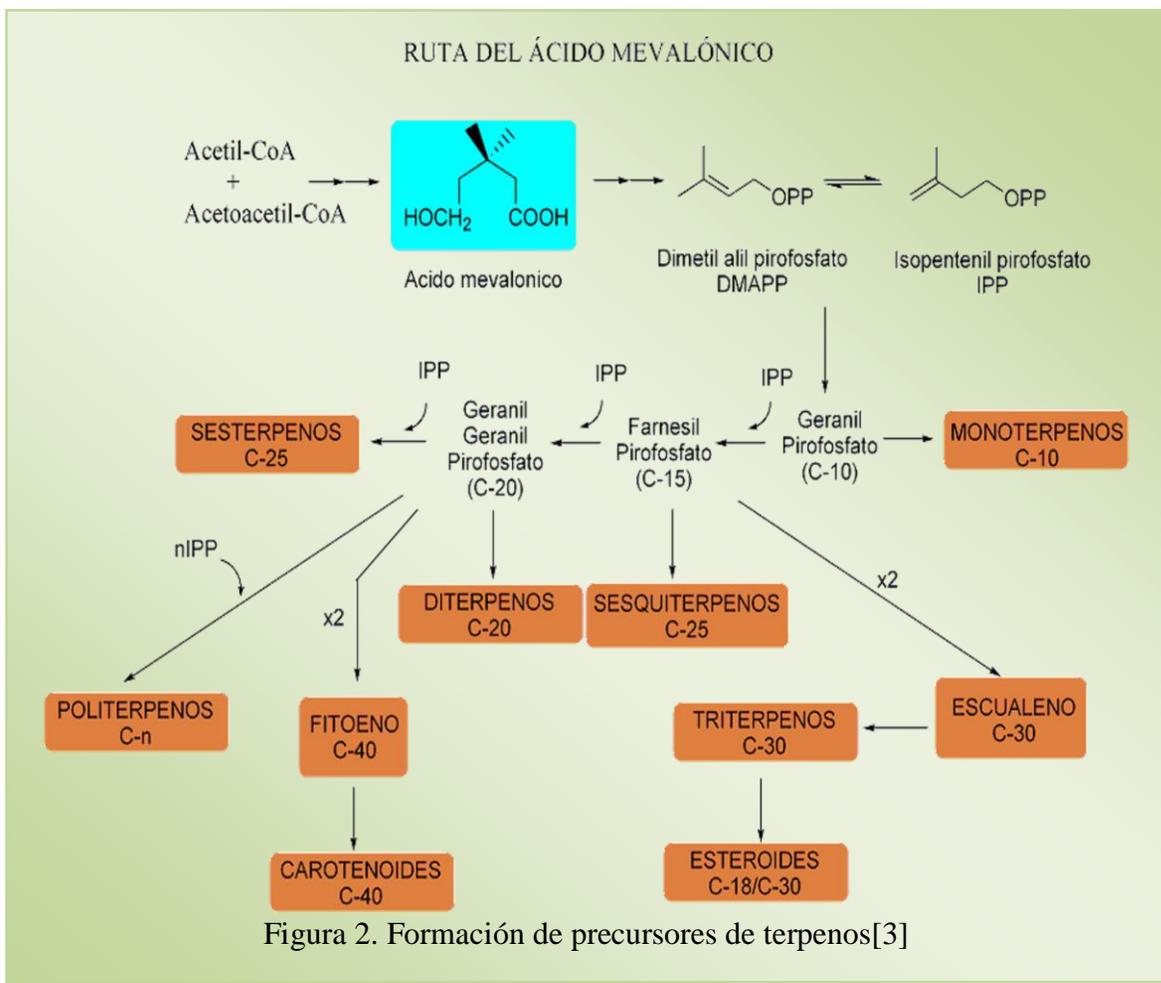


Figura 2. Formación de precursores de terpenos[3]

Derivan biogénicamente del ácido mevalónico, esquematizado en la Figura 2, de la formación de precursores de terpenos. Ejercen la función de precursores diferentes ésteres pirofosfóricos de alcoholes en (C<sub>5</sub>)<sub>n</sub>, formados por la adición secuencial de una unidad en

C<sub>5</sub>, el pirofosfato de isopentenilo (IPP), sobre una molécula estérter. El pirofosfato de dimetilalilo (DMAPP), formado a partir del IPP por isomerización, es el primer término de la serie. La condensación mediante unión “cabeza-cola” de estos dos últimos compuestos origina el geranilpirofosfato (GPP), precursor de monoterpenos. El acoplamiento al GPP de nuevas unidades de IPP origina moléculas de mayor peso molecular, incrementándose el número de carbonos de cinco. También hay monoterpenos “irregulares” en los que la regla isoprénica no es respetada, y son producto del acoplamiento de dos unidades de DMAPP que dan lugar a los triterpenos y carotenos.[58]

Por lo tanto, en el grupo de los terpenoides, se incluyen a los fitoesteroles, carotenoides, monoterpenos, sesquiterpenos y saponinas. Los carotenoides, han demostrado en numerosos estudios *in vitro* que son buenos agentes antioxidantes funcionando como secuestradores de radicales libres y de especies reactivas de oxígeno. Son considerados agentes anticarcinogénicos, ya que ha sido confirmada la intervención efectiva de este tipo de compuesto, tanto a nivel de la iniciación como en etapas más avanzadas de la carcinogénesis, también son capaces de regular la comunicación mediante uniones gap entre células y se han reportado efectos en la proliferación y la transformación celular. Una dieta suplementada con β-caroteno, retinol, α-tocoferol o vitamina C es beneficiosa para la reducción del cáncer y el incremento de la longevidad. [59]

Los diterpenos son compuestos caracterizados por poseer una estructura básica de 20 carbonos y proceder del precursor 2E, 6E, 10E-geranilgeranilpirofosfato (GGPP), presentando una gran variabilidad estructural. Pueden dividirse en dos grandes grupos, compuestos acíclicos y compuestos ciclados.[60]

Los compuestos acíclicos son los menos frecuentes, pudiendo ser lineales o poseer un ciclo lactónico o éter. Por su parte, los diterpenos ciclados son clasificados a su vez en: bicíclicos (labdanos y clerodanos), tricíclicos (pimaranos, isopimaranos, abietanos, casanos y

rosanos), tetracíclicos (kauranos, atisiranos, beyeranos y giberelinas) y pentacíclicos (traquilobanos). También se incluyen en este grupo los diterpenos macrocíclicos como los cembrenos, casbenos o taxanos y los diterpenos miscelaneos briarano y vibsano. [58]

El interés farmacológico de los diterpenos radica en que dentro de este grupo se encuentran los diterpenos tricíclicos del género *Taxus* y sus derivados (paclitaxel o Taxol® y docetaxel o Taxotere®), utilizados actualmente en terapéutica en el tratamiento de algunos tipos de cáncer por su acción antimetabólica.[60]

Existen otros diterpenos que presentan interesantes actividades farmacológicas que los convierten en potenciales agentes terapéuticos como las propiedades antihipertensivas del ácido labd-8(17)-en-15-oico y de la forskolina, la antiagregante plaquetaria del carnosol y de los ácidos pimárico, levopimárico y el interés de las quinonas diterpénicas de *Salvia miltiorrhiza Bunge* en el tratamiento de diversas afecciones del miocardio. Propiedades antirretrovirales de la prostratina, antitumorales de la oridonina y la lasiokaurina, antimicrobianas de la salvipimarona, antiparasitarias del ácido kaurenico frente al *Trypanosoma cruzi*, antiinflamatorias de numerosos diterpenos obtenidos de la familia *Lamiaceae* (como la tanshinona IIA y el borjatriol aislados de los géneros *Salvia* y *Sideritis*, respectivamente) además de las propiedades analgésicas y gastroprotectoras del ácido centipédico. Los diterpenos de tipo clerodano, algunos han presentado diversas actividades, destacando las propiedades antiulcerogénicas, antitumorales, citotóxicas y las antiinflamatorias. Algunos diterpenos de tipo clerodano pueden producir efectos indeseables, como los de la especie *Teucrium chamaedrys L.*, y en especial la teucrina A, responsables de la acción hepatotóxica de esta planta.[58]

Los terpenos tienen propiedades antioxidantes que protegen a lípidos y componentes celulares del ataque de agentes oxidantes como radicales libres de oxígeno, superóxido y grupos hidroxilo reactivos. Los más conocidos son el escualeno y los carotenoides,

ampliamente distribuidos en productos vegetales verdes, cereales y leguminosos. Las propiedades antioxidantes del escualeno han sido consideradas para el tratamiento contra el cáncer, así como efecto benéfico en la prevención de enfermedades cardiovasculares pues reduce los niveles de colesterol y de triacilglicérolos en sangre.

Los carotenoides están presentes en vegetales amarillos y rojos, los más conocidos son el  $\beta$  caroteno,  $\alpha$  caroteno, luteína, zeaxantina y licopeno. El consumo excesivo de  $\beta$  caroteno ocasiona elevación reversible en los niveles sanguíneos (carotenemia) pero no genera toxicidad por vitamina A. los carotenoides protegen la piel contra la radiación ultravioleta. Las propiedades antioxidantes de los carotenoides han sido relacionadas en la prevención contra la peroxidación de lípidos y ácidos nucleicos, aterogénesis y cáncer. La ingesta de frutas y vegetales ricos en luteína y zeaxantina reduce el riesgo de la aparición de cataratas y otras lesiones en la córnea.

La estructura de los fitoesteroles y fitoestanoles, es semejante al colesterol de origen Animal. No son sintetizados por el humano, derivan exclusivamente de productos de origen vegetal como aceite de maíz, germen de trigo, nueces, cereales y frijoles; son triterpenos insaturados con uno o dos dobles enlaces entre carbono-carbono. Los más comunes en la naturaleza son los  $\beta$  sitosterol, campesterol y estigmasterol. Pueden formar ésteres con ácidos grasos, ácidos fenólicos o hexosas. Los fitoesteroles y fitoestanoles inhiben la absorción intestinal de colesterol, por ello, su consumo se ha asociado con la disminución del riesgo de enfermedades del corazón, también poseen propiedades inmunomoduladoras que podrían ser benéficas para la prevención del cáncer de colon, cáncer de mama y daño tisular asociado a inflamación.[61]

### 2.2.3 Compuestos fenólicos

Contienen un grupo fenol y un grupo hidroxilo en un anillo aromático, forman un grupo heterogéneo de aproximadamente 10000 compuestos, algunos solubles solo en solventes orgánicos, otros son ácidos carboxílicos y glucósidos solubles en agua y otros son grandes polímeros muy insolubles. Tienen funciones diversas en las plantas principalmente como defensa contra herbívoros y patógenos, atracción de polinizadores, etc. Son biosintetizados básicamente por dos rutas la del ácido siquímico y del ácido malónico. La mayor parte de los compuestos fenólicos de las plantas derivan de la fenilalanina, esquematizado en la figura 3. [6]

Los compuestos fenólicos propiamente dichos son: Alcoholes y ácidos fenólicos, Ácidos cinámicos y sus derivados y glucósidos, cumarinas, flavonoides y sus glucósidos, catequinas, fenoles condensados, taninos, como el  $\alpha$ -tocoferol, carotenoides, ácido ascórbico, entre otros. En general se les ha descrito importante actividad antioxidante y actúan como inhibidores de los radicales libres que catalizan la oxidación de los lípidos. [62]

Este grupo de compuestos están presentes en las verduras y frutas ejerciendo una potente acción antioxidante necesaria para el funcionamiento de las células, protegiéndolas mediante la reducción del daño y deterioro oxidativo. Los alimentos con mayor contenido de antioxidante fenólicos son: el frijol de soya, por su contenido de isoflavonas y ácidos fenólicos, el te verde y el te negro, por su contenido de polifenoles y catequinas, el café contiene esteres fenólicos, el vino tinto, ácidos fenólicos y polifenoles, el romero, ácido carnósico y ácido rosmárico, los cítricos y otras frutas bioflavonoides y chalconas, la cebolla quercetina y camferol y las aceitunas polifenoles. Las bayas contienen altos niveles de flavonoides polifenólicos y antocianinas. Hay fuerte y convincente evidencia de que los extractos y fitoquímicos de las bayas modulan los biomarcadores de daño en el DNA y los



Los mecanismos anticancerígenos incluyen la modulación de la activación de carcinógenos y la desintoxicación, la disminución de la unión al DNA de los carcinógenos, la inhibición del daño oxidativo del DNA, la alteración en la señalización celular y transformación maligna y la inhibición de la invasión celular y metástasis. [65]

Los polifenoles, agrupan a los flavonoides (como los flavonoles, las flavononas, las isoflavonas), las antocianinas, los taninos y los lignanos, muchos de los cuales se encuentran presentes en frutas, vegetales y bebidas muy populares como el té y el vino, se ha planteado que estos compuestos tienen propiedades antioxidantes, antimutagénicas, anticarcinogénicas. [64] Se conoce que inhiben la producción de bisulfitos en órganos digestivos, además de proteger y estabilizar el genoma. Sin embargo, algunos de ellos resultan mutagénicos y/o pro-oxidantes ya que intervienen en vías bioquímicas esenciales que involucran topoisomerasas, prostanoides y traducción de señales. [8]

Se ha comprobado que los extractos de frutas de mirto (*Myrtus communis L.*) son potentes depuradores de radicales libres, mediante la donación de electrones, haciéndolo muy estables y concluyendo con la cadena de radicales, por lo que se cree podría ser importante para proteger el DNA celular, esta eficacia como antioxidante se debe a su alto contenido en polifenoles, además de los flavonoides presentes en el extracto de metanol que impiden las lesiones oxidativas, de esta manera que sustenta que el consumo de frutas de mirto puede ofrecer algunos beneficios dietéticos al proteger contra la peroxidación lipídica y eliminación de radicales libres, por lo que puede tener un efecto quimioprotector, además de ser una fuente alimentaria puede utilizarse con fines medicinales. [66]

Estudios recientes han demostrado que infusiones de *Alloysia triphylla* (cedrón) y *Peumus boldus Molina* (boldo) poseen un efecto protector de daño genético al incrementar significativamente el estatus antioxidante del plasma de ratones de experimentación

evaluado mediante las técnicas de FRAP (Capacidad de reducción férrica en Plasma) y peroxidación lipídica. [67]

También se ha estudiado el efecto antigenotóxico de la infusión de *Aloysia triphylla* mediante la técnica del EC, debido al interés en sus compuestos polifenólicos antioxidantes contenidos en el extracto acuoso, tales como los flavonoides y ácidos fenólicos, se investigó el efectos quimioprotector contra el daño genético inducido por acrilamida con la versión alcalina del SCGE, donde se encontró que la infusión puede ejercer una acción de quimio protección probablemente debido al barrido de radicales libres. [67]

Se ha estudiado la antigenotóxicidad de tres extractos de *A. keiskei* , *Javanica o.* y *B. oleracea* mediante el SCGE, donde se evaluó la actividad antimutagénica en contra de la aminas heterocíclicas 2-amino -3- methylimidazo [4,5 -f] quinolina (IQ) , 2- amino-3 ,8- dimethylimidazo [4,5 -f] quinoxalina (MeIQx) y 2- amino-3 ,8- dimethylimidazo [4,5 -f] quinoxalina (PhIP) en presencia de un sistema de activación metabólica exógena. Los datos sugirieron que no hay un efecto antimutagénico consistente al no ser los resultados de significancia estadística. A pesar de que se confirmó una alta actividad antioxidante de los tres extractos de plantas, que al consumirse en conjunto genera un efecto cóctel que puede ser beneficioso debido a la concentración de fitoquímicos. [68]

#### 2.2.4 Compuestos que contienen nitrógeno

En este grupo están incluidos los alcaloides, glucósidos, glucosinolatos y aminoácidos no proteicos, son de gran interés por su toxicidad para el hombre y sus propiedades medicinales. Se biosintetizan a partir de aminoácidos comunes como la lisina, tirosina y triptófano. Los glicosidos cianogénicos y los glucosinolatos, son compuestos no tóxicos por sí mismos, estos últimos se degradan para liberar sustancias de defensa volátiles, liberan compuestos responsables del olor y el gusto como en el brócoli y el rábano [6].

Los alcaloides comprenden una familia de más de 15000, se encuentran en un 20% en las especies de plantas vasculares, como su nombre lo indica son alcalinos, cargados positivamente y generalmente solubles en agua, conocidos por sus impresionantes efectos farmacológicos sobre animales vertebrados. En las plantas actúan como defensa frente a predadores mamíferos, casi todos los alcaloides son tóxicos para los humanos cuando son ingeridos en cantidades suficientes como la estricnina, atropina y coniína [6]. Son bien conocidas por sus propiedades analgésicas, bactericidas, antibióticas, psicotrópicas, herbicidas así como su actividad farmacológica por lo que actualmente son muy empleados ya sea de forma natural o semisintética. Entre los alcaloides que contienen pigmentos de monoterpenoides en su estructura están la vinblastina y la vincristina (aislados de *Catharanthus roseus*), utilizadas en la quimioterapia frente a determinados tipos de tumores. [69]

### 2.3 Familia Euphorbiaceae

Familia de plantas que pertenecen al filo Magnoliophyta, del orden Euphorbiales, es una de las familias más diversas entre las angiospermas. [14] La constituyen cinco subfamilias, 49 tribus, 317 géneros y cerca de 8100 especies, distribuidas principalmente en las zonas tropicales y subtropicales del mundo. En México se han encontrado 50 géneros y 826 especies; de éstas, 55.52 % son endémicas. Estos números ubican a *Euphorbiaceae* como la sexta familia en importancia nacional, atendiendo al número de especies y la cuarta en porcentaje de endemismos. Los géneros con mayor número de especies son *Euphorbia* (241 spp.), *Crotón* (126 spp.), *Chamaesyce* (103 spp.), *Acalypha* (126 spp.), *Jatropha* (48 spp.) y *Phyllanthus* (41 spp.). [70]

En México existen todas las formas de crecimiento representadas en la familia incluyendo las herbáceas anuales, perenes, geófitos, arbustos, árboles y bejucos. Los estados más diversos, con más de 100 especies, son en orden de importancia Oaxaca, Veracruz, Chiapas, Jalisco, Guerrero, Michoacán, Sonora, Sinaloa, Puebla, Nayarit y Tamaulipas. [71]

#### 2.3.1 Genero *Jatropha*

*Jatropha* su nombre proviene de los vocablos griegos Jatos (doctor) y Trophe (Alimento), es un género del que se conocen más de 175 nativas de África, Norte América y regiones del Caribe, entre ellas: *J. costaricensis* G. L. Webster & Poveda, *J. curcas* L., *J. gossypifolia* L., *J. integerrima* Jacq., *J. podagrica* Hook., *J. cinérea*, *J. multifida*, *J. dioica*, etc. Algunas especies de *Jatropha* son utilizadas en la MT en varias ciudades como la India, África, Portugal y México, estudios han reportado la presencia de metabolitos secundarios en las plantas de este género como: alcaloides, terpenos (diterpenos, triterpenos) lignanos, y péptidos cíclicos, [16] flavonoides, y fitoesteroles. [17]

En México se encuentran 45 especies de las cuales el 77% son endémicas.[71] Generalmente son arbustos o árboles caracterizados por un exudado transparente o coloreado que emana cuando la planta sufre algún daño, sus hojas son alternas y su fruto capsular contiene de una a tres semillas ovoides o su globosas. Se les conoce comúnmente como “piñoncillo”, “piñón o pistache mexicano” por la forma de sus semillas, o “sangre de grado” aludiendo al abundante exudado que generalmente pinta de color rojo oscuro [72].

Una de las especies más estudiadas es la *Jatropha curcas*, debido a que sus semillas son ricas en aceite y se utilizan para la obtención de biodiesel, usos medicinales, producción de jabón. [73] Algunas poblaciones las emplean en algunos lugares de México para consumo humano, solas tostadas en comal o combinadas con otros ingredientes para la preparación de diferentes platillos. [74]

Otras especies se están estudiando ya que se sabe de su empleo en MT en diferentes partes de África, Asia y América, lo que ha motivado una exploración química en busca de sustancias con acción antibacterial, antimicótica, anticancerígeno e insecticida, algunas especies ya han sido estudiadas y han demostrado tener alguno (s) de estos efectos [75].

### 2.3.2 Usos terapéuticos de especies del genero *Jatropha*

En algunos productos naturales del genero *Jatropha spp.*, se han reconocido actividades biológicas como antiinflamatoria, antimicrobianos, [18] antitumoral y citotóxica [19] así como promotor de la actividad tumoral [20]. En general se utiliza látex fresco para el tratamiento de ampollas en la boca, granos y sarna, las hojas en infusión para tratar las úlceras, heridas infectadas y diarrea. Las semillas y hojas se utilizan como laxantes. [16]

- *Jatropha unicostata* el extracto metanolico ha demostrado tener actividad antibacteriana contra bacterias Gram positivas y cepas de *Staphylococcus multirresistentes*. [76]
- *Jatropha multifida L.* El extracto de metanol crudo mostró tener una fuerte actividad anti fúngica contra *Cryptococcus neoformans*. [77]
- *Jatropha gaumeri*, el extracto de metanol de las raíces y hojas ha mostrado actividad antimicrobiana y antioxidante. De la purificación biodirigida del extracto de raíz se obtuvieron dos diterpenos: 2-epi-jatrogrossidione: Tipo rhamnfolano con actividad antimicrobiana contra *Bacillus subtilis* y 15-epi-4E-jatrogrossidentadiona: Tipo lathyranos sin actividad. [16] Del extracto de las hojas se identificó  $\beta$ -sitosterol (antilipidémico) y Triterpenos como  $\alpha$ -amirina,  $\beta$ -amirina (analgésicos y antipiréticos) y Taraxasterol antioxidantes que inhiben la per oxidación lipídica y con efecto antitumoral en ratones. [78]

- *Jatropha curcas*, en el látex de la especie, se han identificado los siguientes compuestos: jatrophina, jatropham, jatrophona y curcain (proteína, enzima proteolítica). Se utiliza para el tratamiento de enfermedades de la piel, llagas, alivio de picaduras de abejas y avispas, en cuba y varias partes del mundo para el dolor de muelas, quemaduras, hemorroides, tiña y úlceras, etc. [79] Jatrophina y jatropham tienen propiedades anticenrígenas. [80] Se utiliza el extracto de la hoja. El extracto butanólico de las hojas secas en concentraciones de 0.2 mg/ml tiene actividad espasmolítico importante en íleon pero la cromatografía es dudosa. El extracto hidroetanólico a dosis de 0.25 mg/Kg vía IP en ratones potencializa la acción de los barbitúricos y muestra actividad diurética. El diterpeno  $\beta$ -curcusone demostró que actúa como antimetastásico en células humanas *in vitro*. La vitexina, isovitexina junto con otros factores son utilizados contra la malaria, reumatismo o dolores musculares. La savia contiene una enzima proteolítica la curcaína, con actividad antimicrobiana contra *Cándida albicans*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, [81] Sindbi y *Microsporium canis*. Tiene actividad antiviral significativa contra el virus del Herpes, en Panamá. [82]

Se recomienda utilizar la planta con precaución ya que puede ser perjudicial cuando se ingiere por la presencia de la toxoalbumina Curcin la cual ha demostrado propiedades antitumorales [83] y el ácido cianhídrico (HCN), contenido en mayor proporción en las semillas, que las hace tóxicas para el consumo humano, puede provocar depresión, complicaciones circulatorias en niños y manifestaciones gastrointestinales. En ratones administrada vía oral provoca efectos antiestéril y la administración en cabras a dosis de 1g/Kg/día de semillas provocó un cuadro de congestión hepática, reducción de la concentración de glucosa, alteraciones en los hepatocitos y graves modificaciones hematológicas. El estigmasterol muestra fuerte efecto antiinflamatorio, de aplicación tópica, reduce el edema, inhibe la actividad metalloperoxidasa. La  $\alpha$ -amirina es un antiinflamatorio para inhibir la PKA (Proteína quinasa A). La raíz se utiliza como antídoto contra el veneno de serpientes y para controlar el sangrado de encías. La aplicación externa del aceite es útil contra enfermedades de la piel y reumatismo, estimulante del crecimiento del cabello, es

arborificante, emético y laxante. Indicado para hidropesía, ciática, parálisis y lesiones cutáneas de animales. [17]

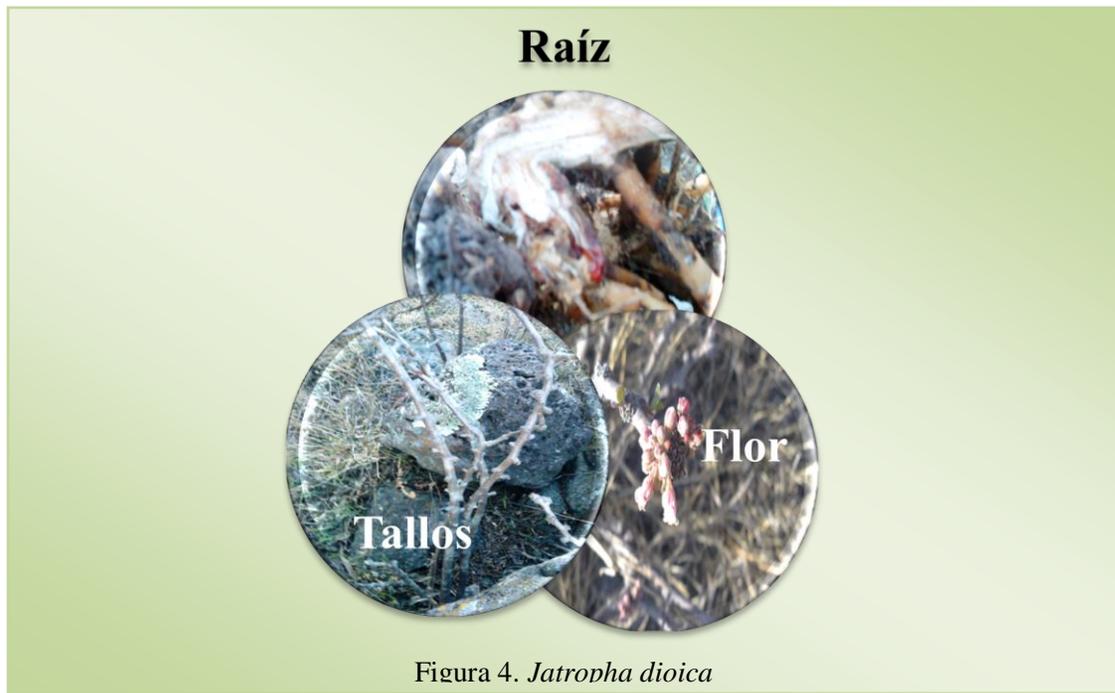
- *Jatropha gossypifolia*, en la corteza y raíz contiene el alcaloide jatrophina ( $C_{14}H_{20}O_6N$ ). La cocción de la corteza se utiliza para la blenorragia. La hoja contiene Histamina, Vitexina, Taninos, Apigenina e Isovitexina, la infusión, es tomada en pocillos (tazas) para aliviar cólicos. El extracto de hojas se ha reportado inactivo. Las raíces y tallos contienen lignanos. El látex al contacto con la piel provoca dermatitis. Las semillas contienen esteres diterpenicos derivados del forbol, de efecto irritante con proteína toxica curcina, utilizadas como purgantes. La raíz contiene un diterpenoide macrocíclico y jatrophina, la infusión (1 manojo en 1 litro de agua) es tomada por tazas, como diurético para inflamación de la vejiga. Se ha aislado en la raíz la jatrophona y 3 derivados de diterpenoides utilizados en el tratamiento de tumores. De los frutos y de la raíz se han obtenido extractos etanólicos que muestran actividad depresiva del Sistema Nervioso Central en ratones administrados por v. ip. El extracto etanólico de la raíz administrado vía i.p. antagoniza las convulsiones inducidas por la esticnina en el ratón. En ratas el extracto de raíz inhibió el crecimiento del sarcoma 180, carcinoma pulmonar de Lewis, leucemia P-388, Carcinoma de Walker, actividad atribuida a la jatrophona. Clasificado en categoría A para tratamiento de diarrea y anorexia. [82]
- *Jatropha neopauciflora Pax* el extracto hexánico, de acetato de etilo y de metanol han demostrado tener actividad antibacteriana frente a *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermis*, *Sarcina lutea*, *Basillus subtilis*, *Vibrio cholerae*, el extracto hexánico mostro actividad para *Vibrio cholerae CDC V 12* y *Yersinia enterocolitica*, y el extracto de acetato de etilo y Metanol mostraron actividad contra *Shigellaboydi*, coincidiendo su uso en la MT de acuerdo al consenso de informantes de San Rafael Coxcatlán, Puebla [84].

## 2.4 *Jatropha dioica* Cerv.

Su nombre común es Sangre de drago o sangre de grado, pertenece a la familia de las *Euphorbiaceae*, también se le conoce como *Jatropha spathulata* (Ortega) Muell. Arg. Su nombre se debe a que tiene un jugo incoloro que cambia a oscuro al contacto con el aire. Su nombre en lengua indígena es B'othue. [85]

### 2.4.1 Descripción botánica

Arbusto de 0.5 – 5 m (70 cm) de altura, con tallos oscuros, lisos, correosos, fibrosos, flexibles, tienen jugo claro astringente que al secarse se torna rojizo (látex rojizo), las hojas son fasciculadas lineares a espatuladas a veces lobuladas de 1-7cm, flores blancas con rosa muy pequeñas presentes en época de lluvia y frutos con semilla negra muy globosa de 8-10mm, ver figura 4. [21,40]



### 2.4.2 Hábitat

Originaria de México, habita en sitios de climas seco y semiseco, desde los 1100 a los 2550 metros sobre el nivel del mar, está bien representada en bosque tropical caducifolio, matorral xerófilo y pastizal, se puede localizar desde el Noroeste (NE) hasta en centro del país ver figura 5, crece en las laderas de los cerros, en el plano, en tepetate y en suelo pedregoso en un rango de altitud de 5-2800 m. En el Distrito Federal se localiza en Cuauhtepac Barrio Bajo y Sierra de Guadalupe en la Delegación Gustavo A. Madero, en el Estado de México en San Martín de las Pirámides y Tlalnepantla. [22]

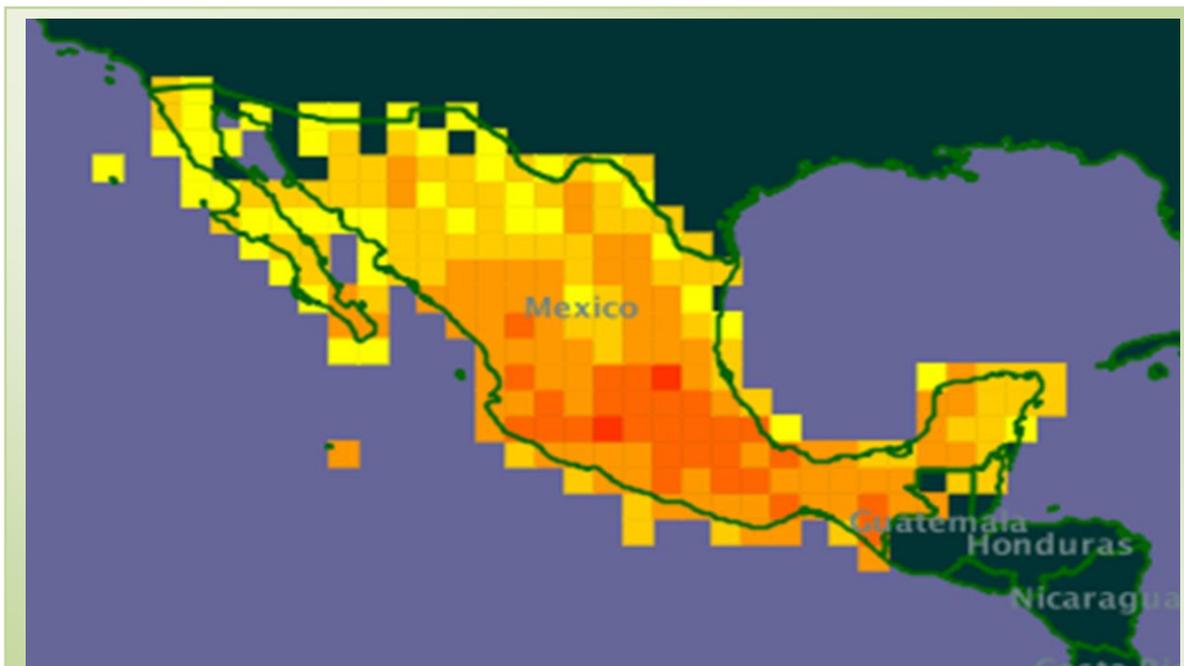


Figura 5. Mapa de distribución de *J. dioica* en México.

Fuente: Herbario IEB del Instituto de Ecología, A.C., México (IE-BAJÓ).

En el Estado de Hidalgo se localiza en el Valle del Mezquital, en el municipio de Ixmiquilpan (Dexthi, Cantamaye, Orizabita, Puerto Dexthi y San Juanico) en donde se elabora un champú para uso humano a base de Sangre de grado, [23] el Cardonal (San Antonio Sabanillas y Cardonal), Meztitlan (Barranca) entre otros. [15, 24] Otros Estados en los que se ha reportado su presencia son: Durango (San Juan Mogote), Zacatecas, Chihuahua (Desierto) [25], [26] San Luis Potosí (Real de Catorce) [28], Tamaulipas [29], Puebla, donde se ha reportado el uso de la *J. dioica* Sessé como planta medicinal [86], [87]

### 2.4.3 Usos medicinales

En la MT Mexicana frecuentemente se utiliza para evitar la caída del cabello, mediante la cocción de los tallos, la planta entera o la raíz machacada en agua, con este líquido se enjuaga el cabello después de lavarlo, cada tercer día. Para las várices y golpes, se hierve la planta y se aplica en forma de cataplasma, o se cuece y se ponen lienzos diariamente sobre los golpes. El agua resultante de la cocción es utilizada en forma de baños para quitar la sarna o en lavados para aliviar la infección de golpes, heridas y granos, aseando previamente con jabón de pasta neutro. Para los ojos irritados, eliminar nubes en los ojos y curar la ceguera, se exprime el fruto sobre ellos dejando caer dos o tres gotitas. Se recomienda aplicar una gota de látex sobre la piel para sacar espinas, dos gotas en las muelas picadas para provocar su desprendimiento, frotar en la parte afectada para contrarrestar el efecto de las úlceras, y masticar las raíces o tallos o ambos para amacizar los dientes. [40]

Planta medicinal, [32] relatada en el siglo XX como: anti disentérica, antiescorbútica, antiséptica, astringente, para la dermatosis, hemorroides, piorrea y como tónico capilar. [24] Considerada planta medicinal fría o fresca [31] de aplicación externa o como infusión para el tratamiento de las siguientes afecciones (Tabla 1).

Tabla 1: Uso de *Jatropha dioica* en la MT Mexicana[40].

	Afecciones	Preparación
<b>Tejido Subcutáneo</b>	Caída del cabello, Contra la caspa y orzuela [34]	Se machaca la planta y se remoja en agua (1 manojo en 4 L de Agua) con la que se enjuaga el cabello, ó se hace un champú con la raíz machacada y cocida en jabón amarillo.
<b>Problemas Odontológicos</b>	Dolor de dientes, amacizar la dentadura y para la piorrea (encías) Avalado por estudio clínico.	Las hojas, tallos y raíces se remojan en agua y se hacen buches, o se masca la raíz, ó se unta el agua (látex) del tallo en las encías o se mascan.
<b>Piel</b>	Quitar callos, sacar espinas, parar hemorragias, cicatrizar heridas, quitar granitos, salpullido.	Se unta el jugo de los tallos.
<b>Otros</b>	Lavar heridas, dolor de riñones, espalda y corazón, problemas de digestión “empacho”,	Cocción de la raíz (3 raíces en 1 L de Agua), Infusión de aplicación tópica o para beber [24].
	Debilidad por Reumas, varices y dolor de piernas	En $\frac{3}{4}$ de alcohol y $\frac{1}{4}$ de Agua se deja curtir la planta a oscuras por 22 días para después untarse.
	Cáncer	3 gotas del jugo del tallo (Látex) en 1 L de Agua tomada como agua de uso todos los días. Decocción de la raíz, tomada como agua de tiempo. [21]

Las semillas se comen crudas pero en poca cantidad pues en exceso provocan vómito o diarrea. [30] Se obtienen por recolección y se encuentra disponible durante todo el año en el Mercado de Sonora de la Cd. De México. [34]

La planta también ha sido utilizada para el control de microorganismos patógenos, actividad demostrada a nivel de laboratorio, invernadero y campo. Los constituyentes biológicos activos de la *J. dioica* que proveen la actividad antimicrobiana son metabolitos secundarios, como polifenoles, flavonoides y terpenos, los cuales forman parte del mecanismo natural de defensa de la planta contra artrópodos y microorganismos. [88]

En el hombre se ha investigado el efecto de aplicaciones locales de un extracto alcohólico (en frío) diluido con agua al 50%, en 6 pacientes con paradontosis o movilidad dentaria durante un periodo de 2 meses. El seguimiento de cada paciente duró 6 meses. Se obtuvo una reducción del 80% en la movilidad dentaria de los pacientes establecida en base al estudio radiográfico inicial y la secuencia radiográfica cada tres meses, así como en base a la historia clínica y los métodos de laboratorio tradicionales.[15]

#### 2.4.4 Fitoquímicos de la *J. dioica*

Se le han identificado diterpenos, entre ellos el riolozatriona, la citlalitriona, el Jatropholona B y  $\beta$ -Jatrophona, además de un esteral, el  $\beta$ -sitosterol, resina, saponinas, alcaloides, ácido oxálico y ácido elágico [35].

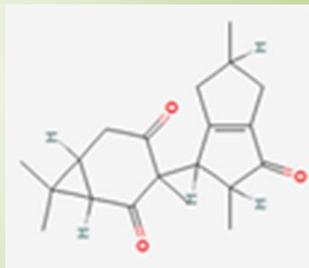


Figura 6. Estructura química del riolozatriona.

Fuente: [www. Chemdrug.com](http://www.Chemdrug.com)

Riolozatriona: Se ha extraído de la raíz de la *J. dioica*, y ha mostrado actividad antibiótica frente a *S. aureus*. La actividad biológica del riolozatrione purificado no ha sido reportada.

Citlalitriona: diterpeno (14, C<sub>20</sub>H<sub>26</sub>O<sub>4</sub>, Sr. 330.40) aislado de extractos de la raíz y tallo de la *J. dioica* y *J. integerrima*, y de todo el material de planta seca de *J. gossypifolia*. Su estructura está estrechamente relacionada con la de jatrophatriona / jatrophona, los cuales comparten un centro altamente sustituido 5-9-5 núcleo y han mostrado tener efectos antitumorales *in vitro*, por lo que la citlalitrione ha sido considerada para la construcción de nuevos de agentes contra el cáncer. [37]

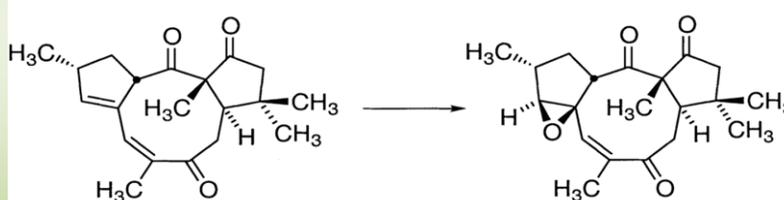


Figura 7. Estructura química de jatrophatriona y citlalitriona. [9]

Jatropholona B: en un modelo de HCl / EtOH induciendo las lesiones gástricas en ratones ha mostrado tener una fuerte acción gastroprotectora, reduciendo las lesiones en un 83-91%, no es citotóxico en células AGS y fibroblastos. También has mostrado actividad antiproliferativa a una concentración  $>100\mu\text{M}$  en líneas celulares de fibroblastos CCL-171, AGS CRL-1739, HTB-58 de pulmón, de vejiga HTB-1, leucemia CCL-240.[89] [36]

$\beta$ -Jatrophona: Diterpeno macrocíclico, que posee múltiples actividades biológicas como citotoxicidad, inhibición de la liberación de insulina, efecto de relajación de la contracción muscular inducida, acción relajante en la vena portal de rata, la inhibición de la activación de linfocitos, actividad antiprotozoos, inhibición de las células tumorales, actividad molusquicida y efectos gastroprotectores.[89-94] Presenta susceptibilidad a la adición conjugada nucleófila lo cual se sugirió es responsable de la actividad antitumoral de jatrophona *in vitro*[9]. Sin embargo es necesario estudios *in vivo*, pues podría dirigirse como un agente potencial terapéutico.[89] [37]

$\beta$ -sitosterol: Ha demostrado tener actividad quimioprotectora conocida, al inhibir el crecimiento de líneas celulares de cáncer de colon, al inducir la apoptosis por barrido de especies reactivas de Oxígeno (SRO) y suprimir la expresión de  $\beta$ -catenina y PCNA. Está presente en cantidades variables en varias especies de plantas, se sabe que tiene actividad estrogénica. [38]

Recientemente se le identifico y cuantifico un tanino, el Ácido elágico (EA) reportándose una concentración de  $0.81\text{mgg}^{-1}$  de planta, considerándose una fuente alternativa de este antioxidante natural, además de tener otras propiedades relacionadas con la salud, como antiesteroesclerótico, anti carcinogénico, al reducir el cáncer de colon humano, próstata, cervical, lengua, esófago y piel. [95]

El extracto MeOH mostró actividad antibacteriana contra *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Cándida albicans*, *Cryptococcus neoformans* y *Sporotrix schenckii* [15] y de la raíz se obtiene un aceite esencial, resina, saponinas, alcaloides y ácido oxálico que poseen una fuerte actividad contra *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*. [39] De los tallos emana un látex rico en taninos con actividad antibiótica contra *Staphylococcus aureus* [37]

## 2.5 Quimioprotección

El daño al DNA es considerado la lesión biológicamente más relevante con potencial mutagénico. Aunque la mayoría de los agentes exógenos tienen el potencial de dañar muchos componentes de la célula. Responder adecuadamente a los agentes agresores, para mitigar la toxicidad celular o el inicio de una respuesta de muerte celular adecuada, es crítica, particularmente en los organismos multicelulares. Si la respuesta es incorrecta pueden facilitar los efectos nocivos, tales como un genoma desestabilizado y enfermedades tales como el cáncer.[96]

El hombre está cada vez más expuesto a los agentes mutagénicos, lo que ha incrementado el grado de mutación (modificación del material genético) ya sea en células germinales, así como de células somáticas que pueden contribuir a varios desórdenes e incluso, estar relacionadas en la patogénesis de algunas enfermedades degenerativas crónicas tales como la diabetes mellitus, enfermedades cardiovasculares y los procesos oncogénicos. [10]

Sin embargo todos los organismos tienen mecanismos esenciales de protección contra daños endógenos o exógenos, especialmente el DNA ya que al ser portador de la información genética es de vital importancia prevenir la generación de mutaciones. Los daños al DNA como cortes en cadena doble (CCD) pueden ser provocados por agentes exógenos como las radiaciones ionizantes, los rayos ultravioletas (UV) y algunos compuestos químicos sintéticos o naturales, con acción mutagénica o carcinogénica, o antitumoral ó por causas endógenas debidas a accidentes o problemas colaterales como el estrés oxidativo, errores en la replicación del DNA, cortes durante la meiosis o por formación de compuestos mutagénicos productos del metabolismo. [97]

Cuando sucede alguno de ello el genoma debe ser reparado y la célula contienen toda una maquinaria enzimática encargada de realizarla con una alta efectividad. Sin embargo, ningún sistema es completamente infalible dando origen a re arreglos cromosoma les tales como las translocaciones, deleciones y amplificaciones que desencadenan una serie de reacciones, como detener el crecimiento celular, causar la muerte programada de la célula (apoptosis), o iniciar una proliferación celular desmedida (cáncer). Para reparar el daño del DNA la célula eucariota tiene tres vías de reparación: por recombinación homóloga (RH), por alineamiento de cadenas sencillas (ACS) y por unión de cadenas sin homología (UCSH). Cuando las células se encuentran en una situación estresante o difícil de sobrevivir, se activa el gen llamado p53 que responde a diversos factores que pueden provocar estrés y daño a DNA, porque ATM puede fosforilarlo y desencadenar una reacción que lleva a la célula a decidir si detiene su crecimiento o muere por apoptosis. La farmacogenómica estudia la diversidad genómica humana y su influencia en la respuesta a la acción de fármacos. [97]

El riesgo celular de acumular mutaciones potencialmente oncogénicas depende de la frecuencia con que se producen las lesiones en el DNA y de la capacidad que tengan las células de reparar dichas lesiones. La estabilidad genética viene dada por el equilibrio entre ambos procesos [98] y la misma puede ser alterada por la acción de varios agentes ambientales, provocando un efecto mutagénico. [99]

Las respuestas al daño del DNA (DDR) son componentes críticos de los supresores de efectos nocivos de agentes genotóxicos, por progresión de control del ciclo celular, reparación del DNA y la apoptosis. [100]

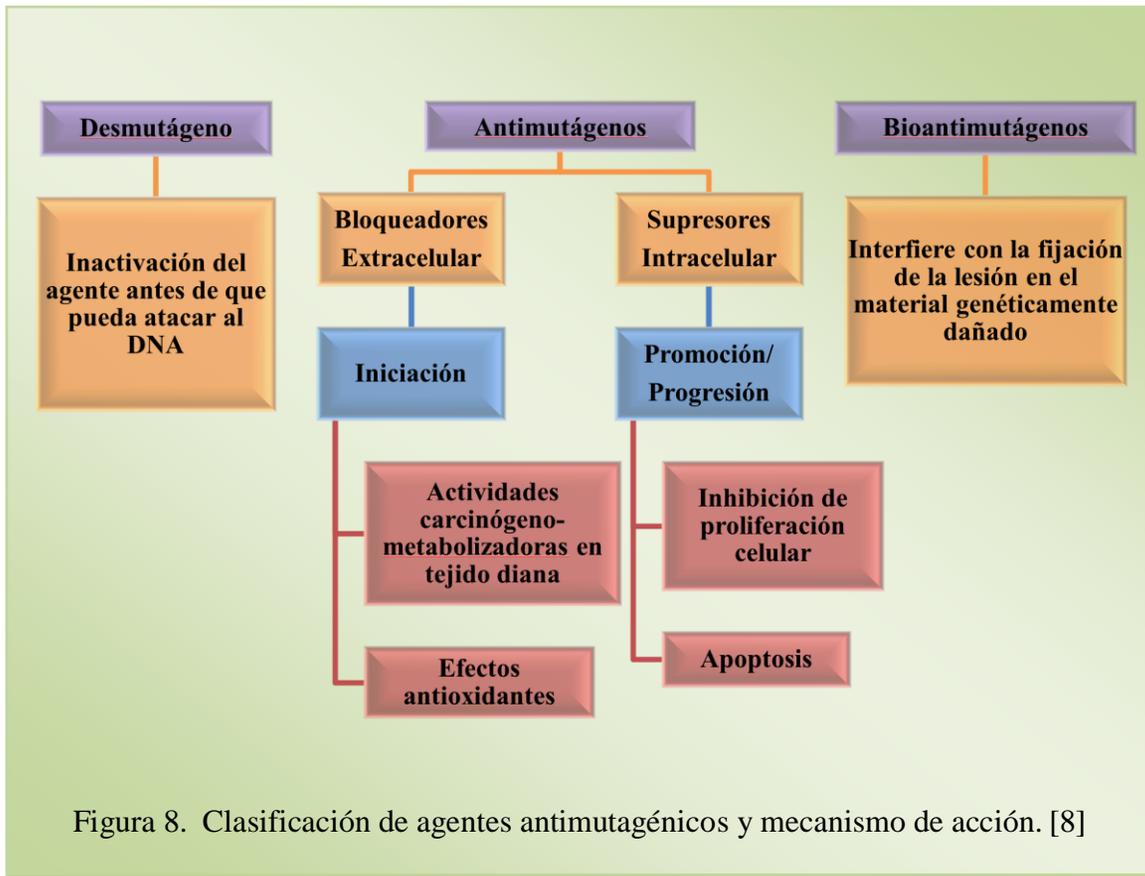
Informes recientes ha comprobado que la DDR implica procesos celulares pleiotrópicos que no son los componentes DDR central. Incluso se han identificado los genes implicados en la respuesta al daño de una manera imparcial, de RNA basada en células contra el

genoma de *Drosophila* y el agente alquilante Metilmetanosulfonato (MMS) para inducir el daño celular y afectar la supervivencia de la célula, donde se comprobó que la mayoría de las rutas están implicadas en la reparación del DNA, también identificaron varias vías con funciones biológicas diversas como la vía del TOR, Transcripción, traducción, proteosoma, síntesis de glutatión, síntesis de ATP y señales de Notch, que son igualmente importantes en la supervisión contra daño celular. [101]

La quimioprotección fue originalmente definida por Sporn en el año 1976 para indicar: “la potenciación farmacológica o fisiológica mediante las cuales la progresión de una lesión preneoplásica puede ser prevenida, detenida o revertida”. [11] Los niveles de prevención dependen del momento o estado de salud del individuo, la quimioprotección primaria para los individuos sanos, la quimioprotección secundaria para aquellos pacientes que se encuentran en estado preclínico y la quimioprotección terciaria para los que ya tienen establecida la enfermedad. [56]

La antimutagénesis es el proceso mediante el cual se reduce la frecuencia de mutaciones espontáneas o inducidas, la acción antimutagénica de un compuesto queda definida como la característica o acción de esta sustancia para disminuir o evitar el daño mutacional en el DNA de la célula. [102] Pueden ser agrupados en dos categorías: los agentes bloqueadores, inhibidores de la iniciación del tumor al impedir que los carcinógenos alcancen o reaccionen con los sitios diana y los agentes supresores, inhibidores de la promoción/progresión [8] previniendo la evolución de los procesos neoplásicos. [103]

Los antimutágenos, inhibidores de fase 1 actúan de forma extracelular, los de fase 2 intracelularmente, los desmutágenos inactivan al agente genotóxico antes de que pueda atacar al DNA y los bioantimutágenos interfieren con la fijación de la lesión en el material genético dañado ver figura 8. [8]



Existen varios agentes quimiopreventivos que operan mediante múltiples mecanismos, con una alta eficacia y un amplio espectro de acción. Se ha planteado la conveniencia de combinar los agentes quimiopreventivos para que exista una complementación de los mecanismos de acción. [12]

Para determinar el tipo de potencialidad antimutagénica de un compuesto investigado, el procedimiento más generalizado consiste en evaluar, comparativamente, las respuestas mutacionales, al aplicar tres variantes de tratamiento: contratamiento (compuesto y mutágeno a la vez), pre tratamiento (primero el compuesto y después el mutágeno, solamente) y post-tratamiento (primero el mutágeno y después el compuesto). [12]

## 2.6 Agentes genotóxicos

Debido al incremento en la prevalencia de enfermedades crónicas relacionadas con el daño del DNA, se han utilizado fármacos que actúen de forma fase-inespecífica de manera que puedan afectar a las células dañadas en cualquier etapa del ciclo celular con la finalidad de inhibir el progreso de la carcinogénesis. Uno de estos fármacos son los agentes alquilantes, la acción antitumoral mediada por la unión covalente de grupo alquilo a moléculas celulares, los átomos implicados son el azufre, nitrógeno, oxígeno y fósforo. Su acción citotóxica se debe a la lesión del DNA que determina la inducción de apoptosis celular. La mayoría proceden de síntesis química por lo que su estructura está perfectamente definida. En modelos experimentales han demostrado un mecanismo de destrucción celular dosis dependiente, lo que los hace idóneos para ser utilizados en programas de altas dosis de quimioterapia. [104]

Los alquilantes bifuncionales reaccionan con dos grupos de N-7 Guanina dando lugar al desarrollo de puentes cruzados dentro de la hebra o bien en las dos hebras del DNA lo que provoca rápidamente la rotura de la estructura, inhibiendo la síntesis de DNA y provocando la muerte celular. Otros puntos de alquilación conocidos son el N-3 y O-6 de la Guanina, el N-1, N-3 y N-7 de Adenina, N-3 y O-6 de la Timina y el N-3 de la Citosina. También puede darse alquilación en pares de bases del RNA. [105] La alquilación covalente del DNA es mutagénica y carcinogénica lo que resulta en complicaciones a largo plazo como efectos adversos a largo plazo sobre la espermatogénesis y ovogénesis, así como desarrollo de neoplasias posteriores. [106] La mielosupresión es su principal efecto secundario, pueden inducir lesiones crónicas como atrofia gonadal, esterilidad, nefropatía permanente y fibrosis pulmonar. Son mutagénicos, carcinogénicos y teratogénicos, sobre todo los bifuncionales. Entre los mecanismos de resistencia esta la disminución en la captación y transporte celular de la droga, un incremento en la detoxificación por glutatión, incremento del catabolismo enzimático e incremento en la capacidad de reparación del DNA. [105]

### 2.6.1 Ciclofosfamida (CF)

Es uno de los citostáticos alquilantes bifuncional que se emplea en el tratamiento de neoplasias como linfoma maligno, mieloma múltiple, leucemias, micosis fungoide, neuroblastoma, carcinoma de ovario, de mama, retinoplastoma y enfermedad de Hodgkin. Requiere de la activación por enzimas microsomaes hepáticas (subfamilia CYP3A4), para expresar su capacidad alquilante. Derivado de la mostaza nitrogenada con una cadena lateral biscloroetilamina bifuncional. Los metabolitos activos interfieren con el desarrollo de las células malignas de rápida proliferación. Generalmente se utiliza a dosis de  $500\text{mg}/\text{m}^2$  día por 3 días. [105]

Tiene buena absorción vía oral, las concentraciones plasmáticas máximas se logran a los 60 minutos de administrada. Metabolismo fundamentalmente hepático donde por acción del grupo CYP2B de isoenzimas P450 del sistema microsomal es transformado a su forma activa 4-hidroxiCF, que cambia espontánea y reversiblemente a aldofosfamida, molécula con la cual está en equilibrio. Las dos moléculas (4-hidroxiCF y aldofosfamida), son transportadas por la sangre hacia los tejidos normales y tumorales donde sufren desdoblamiento no enzimático a las formas citotóxicas: mostaza de fosforamida y acroleína. Puede atravesar la barrera placentaria y se excreta en la leche materna, ver figura 9). [5]

Del 5-25% del fármaco se elimina por la orina sin sufrir metabolismo, tras la administración oral presenta una biodisponibilidad del 75%, la unión proteica es nula, aunque alguno de sus metabolitos puede alcanzar una unión de más del 60%. Utilizar con precaución en neutropenia, trombocitopenia, infiltración tumoral de la medula ósea, radioterapia previa, función hepática o renal alterada. Sus efectos secundarios son: cistitis hemorrágica y fibrosis de vejiga que dependen de la dosis y duración del tratamiento. Induce una retención de agua, disminución en el filtrado glomerular, defectos en la

capacidad de concentración y acidosis renal, también puede provocar neurotoxicidad, caracterizada por somnolencia, desorientación, letargia y ocasionalmente convulsiones y coma, [105, 106].

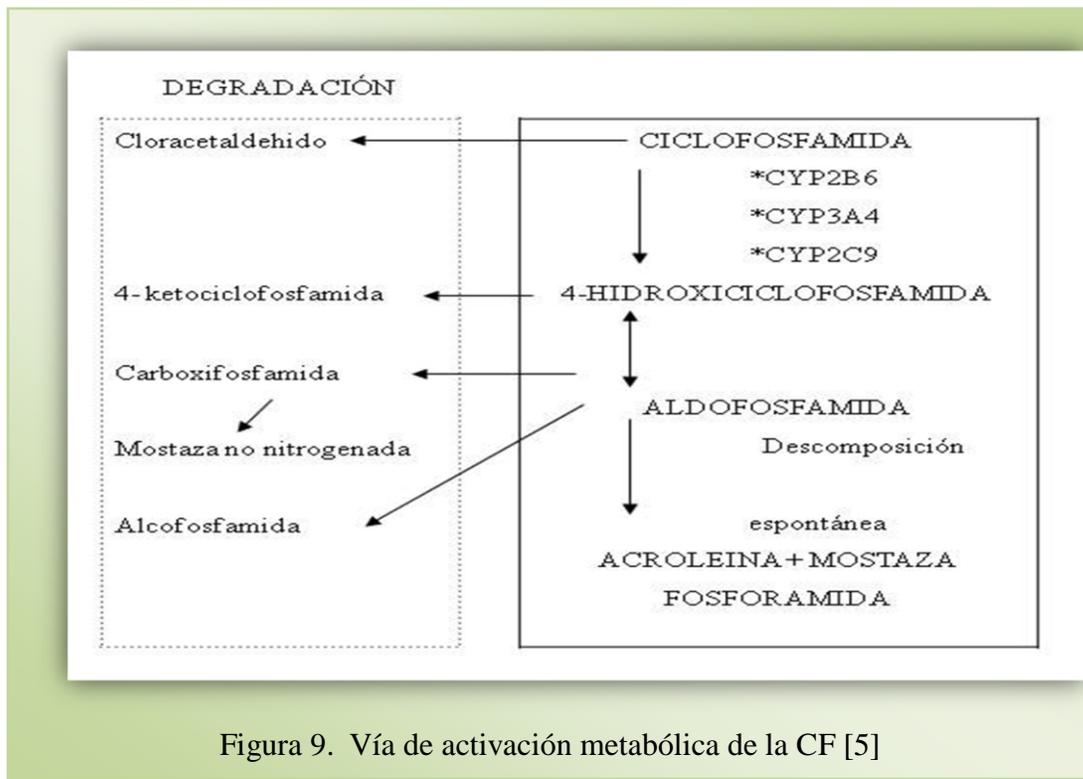


Figura 9. Vía de activación metabólica de la CF [5]

Los efectos a largo plazo son esterilidad (ovogénesis y espermatogénesis) irreversible, incluso se puede llegar a desarrollar segundas neoplasias mieloproliferativas o linfoproliferativas, varios años después de haber utilizado el medicamento. La bioactivación enzimática genera la posibilidad de interacción con inhibidores del metabolismo hepático (cloranfenicol, omeprazol, zumo de pomelo, etc.) como con inductores del mismo (barbitúricos, antiepilépticos, etc.). [107]

Se sabe que la CF, después de su activación forma acroleína, un reactivo altamente electrofónico que provoca estrés oxidativo, además de  $\beta$ -aldehído insaturado, los cuales se sugiere son la causa subyacente de la toxicidad de oxazafosforina, agente citotóxico de la

CF. Los efectos adversos más reportados son la cistitis hemorrágica, la acroleína es el agente responsable del daño estructural de la vejiga, sin embargo se ha comprobado que consumo de Goma Arábica actúa como agente protector contra los efectos nocivos de la CF, mediante la recuperación de la vejiga, reducción de edema y reversiones de tendencias de daño oxidativo, observado incluso a nivel histológico, debido a que la Goma Arábica es un efectivo antioxidante, barredor de especies reactivas de oxígeno. [108]

Se ha comprobado que puede provocar oligospermia y azoospermia en ratones, la administración de CF induce el estrés oxidativo y es citotóxico para células normales, pero el tratamiento previo con algunos agentes quimioprotectores como el ácido lipoico mejora la calidad del semen y redujo el estrés oxidativo y daño en el DNA inducido por CF, demostrando su efecto protector. [107]

Por lo general en los estudios de genotoxicidad *in vivo* se utilizan sustancias mutagénicas conocidas, dentro de las más utilizadas se encuentra la CF, agente alquilante que forma monoadductos y enlaces cruzados entre cadenas en consecuencia de la aparición de rupturas por efectos de los mecanismos reparativos, [109] utilizada con gran efectividad como antineoplásico, pertenece al grupo cloro-etilaminas, con el desarrollo de éste agente se logró mayor selectividad de la droga hacia el tejido tumoral. Considerado un agente alquilante bifuncional, no posee especificidad por fase alguna del ciclo celular. [110]

La CF en dosis de 50 mg/kg v. ip., ha sido utilizada como control negativo en biomodelos experimentales del SCGE, resultando uno de los mejores diseños experimentales para inducir la formación de rupturas de cadena simple y la formación de sitios lábiles al álcali en el DNA en ratas *Sprague Daweley* aumentando considerablemente la frecuencia espontánea en esta especie de rata, siendo útil en estudios de evaluación de drogas que no han sido estudiadas en el ámbito de la antigenotoxicidad y genotoxicidad *in vivo*. [111]

### 2.6.2 Daunorrubicina (DAUNO)

Antibiótico antitumoral citostático, se une con gran avidéz al DNA, mediante un proceso de intercalación, situándose entre pares de bases de la doble cadena del DNA. Su estructura es un núcleo plano de antraquinona unido a un aminoglucósido. El aminoazúcar de la DAUNO se denomina daunosamina. Se han postulado varios mecanismos de acción para explicar su actividad tumoral, como: [110]

1. Intercalación entre las bases de DNA
2. Unión covalente de metabolitos activos al DNA
3. Roturas de las cadenas de DNA mediadas por topoisomerasas II
4. Formación de radicales libres
5. Acción sobre las membranas

Las acciones biológicas que se consiguen con ello son:

1. Efecto citotóxico antitumoral, máximo en fase S mediado por la topoisomerasa II y radicales libres.
2. Efecto mutágeno y teratógeno, debido a la rotura del DNA producido por radicales oxidantes.
3. Efecto cardiotóxico debido en parte a la peroxidación de los lípidos de las membranas de las células cardiacas y por otra parte a la acción directa de los fármacos sobre la membrana celular.[105]

Las antraciclinas son administradas con un amplio rango de esquemas terapéuticos, la toxicidad incluye: mielosupresión, mucositis, náuseas, vómito, diarrea y alopecia, la extravaciación provoca necrosis de los tejidos. Potencializan el efecto de las radiaciones

ionizantes, incluso producen un efecto de reactivación cuando se administran en un periodo posterior inmediato a la radioterapia.

La toxicidad limitante es la cardíaca, manifestada como fallo cardíaco congestivo, la frecuencia de aparición es más elevada al sobrepasar la dosis acumulada de  $550\text{mg}/\text{m}^2$ , en tratamiento concomitante con CF, o radioterapia en zona mediastínica. Las formas liposomales muestran mejor penetración en tejido tumoral debido a su menor tamaño y mayor tiempo de circulación, aprobadas para el tratamiento del sarcoma de Kaposi relacionado con SIDA y enfermedad mucocutánea o visceral.

Farmacocinética: Tiene una rápida captación por los tejidos concentrándose especialmente en hígado, con una vida media de 25 -50 horas. La aldocetoreductasa forma daunorubicinol y otros metabolitos inactivos pero implicados en la cardiotoxicidad. Se elimina por vía biliar en un 40% y un 15-25% por orina. La DAUNO y el daunorubicinol tienen un tiempo medio de eliminación de 18-20 y 25-30 horas respectivamente. Dosis:  $45\text{ mg}/\text{m}^2/\text{día}$  por 3 días en tratamientos de inducción. Incompatible con heparina, 5-FU y Fosfato de dexametasona. Tiene interacción con los barbitúricos, disminuyendo su actividad, también puede disminuir la biodisponibilidad oral de la digoxina. [106]

En un estudio reciente se logró identificar 53 variantes genéticas que mostraron una asociación significativa con DAUNO citotoxicidad inducida por la expresión de 61 genes. También se encontró una correlación significativa entre CYP1B1 expresión y DAUNO IC50 lo que sugiere que CYP1B1 confiere resistencia a la DAUNO, de modo que tiene un componente genético significativo. [112]

### 2.6.3 Metilmetanosulfonato (MMS)

Es un agente alquilante prototipo que ataca a los grupos nucleofílicos, como los que se encuentran en los ácido nucleicos. La metilación de la base resultante desestabiliza el enlace glucosídico, facilitando la producción de las lesiones celulares biológicamente más relevantes de MMS, un sitio a básico en el DNA. Considerando la relevancia fisiológica de los daños de alquilación, estudios recientes utilizando la levadura como organismo modelo para la investigación los efectos globales de los daños inducidos por alquilación MMS. El uso del MMS nos proporciona información sobre la naturaleza de diversas respuestas biológicas a los daños de alquilación como: la viabilidad, la transcripción de genes y la expresión de proteínas. [113]

Utilizado en el tratamiento contra el cáncer que puede también actuar como un mutágeno interfiriendo y causando daño al DNA. Sus moléculas reaccionan directamente con el DNA, el cual no está replicándose, ocasionando cambios químicos en las bases lo que provoca apareamientos incorrectos. Es una transición si se pasa de una base púrica a otra forma de apareamiento de otra base púrica o de una pirimidina en otra pirimidina; o una transversión si una purina se convierte en una pirimidina. Junto con la luz ultravioleta es uno de los agentes mutagénicos más potentes, al igual que con el etil metano sulfonato, dietil sulfato ,etiletanosulfonato, mostaza nitrogenada, etc.

El Etil metano sulfonato introduce un metilo en la guanina. El ácido nitroso elimina el grupo amino de adenina y citosina, convirtiendo estas bases en hipoxantina y uracilo, respectivamente. Hidroxilamina añade un grupo hidroxilo al grupo amino de la citosina, haciendo que la base sufra un cambio tautomérico. Etilitanosulfonato y mostaza nitrogenada pueden producir mutaciones por adición de grupos metilo o etilo a la guanina, haciendo que se comporte como un análogo de base de la adenina y dando lugar a errores de apareamiento. La aflatoxina B1 es un carcinógeno poderoso que se une a la posición N7

de la guanina. La formación de este producto da lugar a la rotura del enlace entre la base y el azúcar, liberándose la base y el azúcar, generando un sitio apurínico. Ver figura 10.

El MMS y CF se han utilizado como controles para evaluar el efecto quimioprotector de algunas sustancias como 2-mercaptoetilamina (MEA) administrada v. ip. 30 min antes o 30 min después, evaluado resultados en la frecuencia de micronúcleos en eritrocitos policromáticos (MNPCEs) inducida por estos los agentes alquilantes. [114]

Se ha observado que el MMS sólo tiene efectos mutagénicos débiles en el hígado sin presentar efectos en la médula ósea en el ratón Muta<sup>TM</sup> y los resultados son negativos para el ratón Big Blue<sup>®</sup>. El MMS induce aberraciones cromosómicas en la médula ósea de ratones observado con la prueba de micronúcleos. Otros estudios *in vitro* e *in vivo* apoyan claramente su actividad clastogénica. [115]

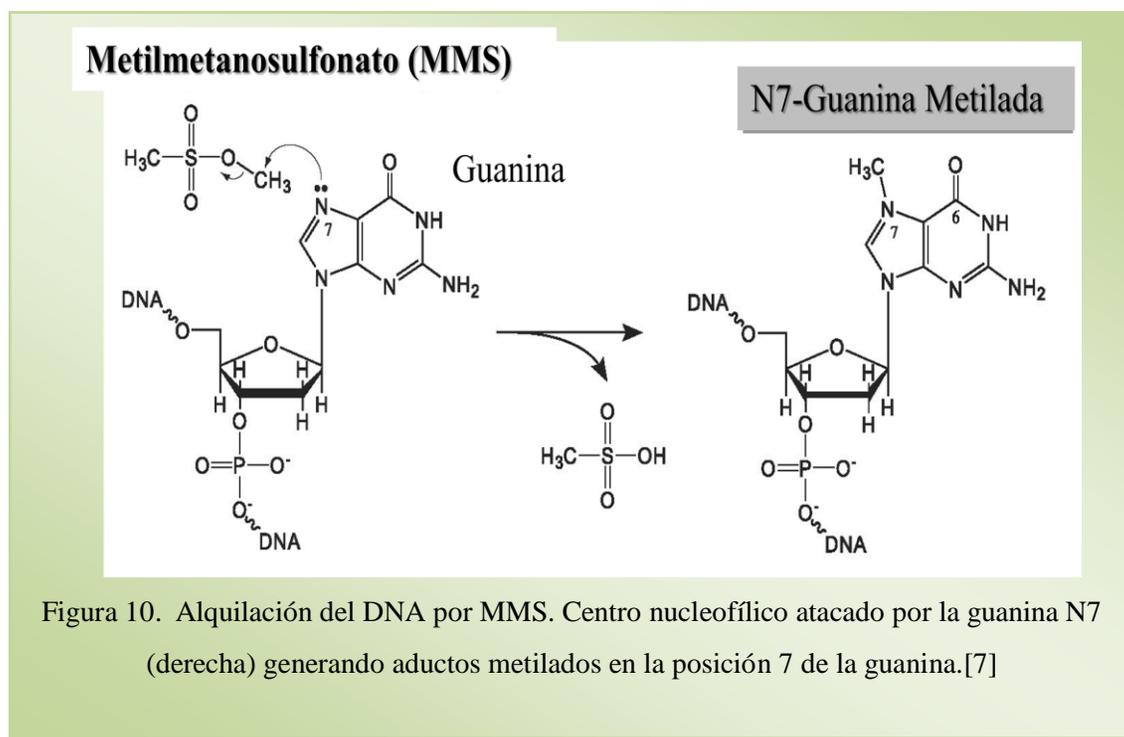


Figura 10. Alquilación del DNA por MMS. Centro nucleofílico atacado por la guanina N7 (derecha) generando aductos metilados en la posición 7 de la guanina.[7]

## 2.7 Ensayo cometa (SCGE)

También llamado electroforesis en gel de células individuales (SCGE), es un ensayo rápido, sensible y un método relativamente simple para detectar daños en el DNA a nivel de células individuales. Combina la simplicidad de técnicas bioquímicas para detectar roturas en la cadena del DNA sencillas y sitios de reparación de escisión incompleta, sitios álcali-lábiles y entrecruzamiento con el enfoque de células individuales de pruebas citogenéticas[116].

Utilizado por primera vez por Ostling and Johansson in 1984, un ensayo neutral en el que se realizaron la lisis y la electroforesis en condiciones neutras, la tinción se realizó con naranja de acridina. La imagen obtenida parecía un cometa "con una cabeza, compuesto de DNA intacto y una cola, que consiste en piezas dañadas o rotas de DNA de ahí el nombre "Comet assay". [41]

### Ventajas

- Recolección de datos a nivel de la célula individual, para realizar análisis estadísticos significativos
- La necesidad de un pequeño número de células por muestra (<10.000 )
- Sensibilidad para detectar daños en el DNA
- Uso de cualquier población de la célula eucariota *in vitro* o *in vivo* [117]

Se ha utilizado para determinar el daño oxidativo del DNA implicado en varias condiciones de salud, para demostrar los efectos protectores de los diferentes factores de la dieta en los estudios de quimioprotección. [118]

Se basa en la capacidad de los bucles de carga negativa / fragmentos de DNA que se elaborará a través de un gel de agarosa en respuesta a un campo eléctrico. El alcance de la migración del DNA depende directamente del presente daño en el DNA en las células. Las lesiones del DNA consiste en cortes en las cadenas después del tratamiento con álcali ya sea solas o en combinación con ciertas enzimas (endonucleasas) que aumenta la migración del DNA. [119]

Al observarlo con el microscopio de fluorescencia, las porciones del DNA que migran fuera de la célula, en dirección al ánodo, aparecen como un " cometa ", el tamaño, forma y distribución del DNA en el cometa se correlaciona con el grado de daño en el DNA. [120]

El más versátil es la versión alcalina *in vivo* (pH>13), desarrollado por Singh y sus colaboradores (1988). Detecta un amplio espectro del daño al DNA (medir los niveles bajos de rupturas de cadenas con alta sensibilidad), se puede aplicar en una gran variedad de tejidos de roedores, tras la administración de agentes de prueba.[121]

Consiste en embeber las células en agarosa de bajo punto de fusión para formar un microgel, someterlas a lisis para eliminar todas las proteínas celulares y permitir el posterior desenrollamiento [122] por la interrupción de los enlaces por puentes de hidrógeno entre las dobles cadenas del DNA bajo condiciones alcalina/neutras. [119, 123]

Al someter al DNA desenrollado a una electroforesis en tampón alcalino, los fragmentos de DNA cargados negativamente o cromatina relajada migran fuera del núcleo en dirección al ánodo para formar un halo, apreciándose una estructura parecida a la de un cometa al teñir el DNA después de la electroforesis. Las células con un aumento de su DNA dañado muestran un incremento de la migración microsomal del DNA siendo las rupturas de doble cadena las causantes de mayor frecuencia de migración del material genético. [124], [125]

En los últimos años se han publicados varios análisis que resaltan el uso y aplicación de estos procedimientos, sus ventajas y limitaciones en genotoxicología, ecotoxicología y estudios de biomonitorio. [122] También ha sido aplicado con éxito en células de las plantas en condiciones de laboratorio. [126]

Se llevó a cabo un estudio para determinar si el SCGE era un complemento útil para el análisis *in vivo*, en el que se determinó que el uso de MN/SCGE es una prueba prometedora para proporcionar más evaluaciones completas del potencial genotóxicos. El Programa Nacional de Toxicología está utilizando este protocolo combinado para la evaluación global de la genotoxicidad de sustancias relevantes para el uso en la Salud Pública. [42]

En otro estudio *in vivo* sobre los efectos genotóxicos del herbicida (Roundup®), evaluado en peces de agua dulce (*Carassius auratus*) expuestos a tres dosis de la formulación de glifosato (5, 10 y 15 ppm), utilizando como control positivo a la CF a una dosis única de 5 mg/l. Se analizaron los micro núcleos en eritrocitos periféricos, y el SCGE para detectar anomalías nucleares y de DNA, los resultados mostraron un aumento significativo dependiente de la dosis frecuencia en micro núcleos y se detectaron anomalías nucleares y saltos en la cadena de DNA, también confirmaron que la prueba de SCGE en la versión alcalina junto con la prueba de MN son herramientas útiles para determinar la genotoxicidad potencial de los diferentes productos comerciales. [127]

### III JUSTIFICACIÓN

Se ha observado un incremento en la incidencia de enfermedades crónico degenerativas provocadas por alteraciones genéticas como el cáncer, el cual de año 2004 a 2007 el comportamiento de los tumores ha presentado patrones estables para los tumores de estómago, hígado, páncreas y esófago y otros han tendido a disminuir, como los tumores de ovario, tráquea, bronquios y pulmón y cuello del útero.[128] De acuerdo con investigaciones realizadas en otras especies pertenecientes al género *Jatropha*, se ha logrado demostrar su efecto antitumoral o anti cancerígeno, lo que nos hace suponer que la *J. dioica*, pudiera poseer un efecto quimioprotector sobre el DNA.

Las enfermedades Crónico degenerativas implican un mayor gasto para las familias [129] lo que ha hecho recurrir a tratamientos de MT. En México se ha reportado el uso de la DJD, para el tratamiento de afecciones bucales, lesiones en piel, paradontosis, cáncer cervicouterino y Leucemia. Es una planta de amplia distribución en el país, y sin embargo, no hay evidencia científica que sustente el efecto quimioprotector si es que lo tuviera, es importante determinarlo pues podría ser una fuente accesible para el tratamiento de enfermedades crónico degenerativas relacionadas con el daño al material genético.

Con la finalidad de detectar el efecto quimioprotector de la decocción de la *J. dioica*, se utilizarán tres sustancias químicas genotóxicas, con farmacodinamia bien establecida: CF, agente alquilante el cual requiere activación por enzimas microsomales hepáticas, la DAUNO antibiótico de las antraciclinas con actividad antitumoral mediado por la topoisomerasa II e inductor de los radicales libres y el MMS, agente alquilante directo cuyos efectos citotóxicos se deben a la transferencia del grupo alquilo en la posición N-7 de la guanina y de N-3 de la adenina.

## IV HIPÓTESIS

Si los compuestos químicos presentes en la decocción de la raíz de *J. dioica* tienen potencial quimioprotector, entonces serán capaces de inhibir el daño genotóxico al DNA inducido por CF, DAUNO o MMS.

## V OBJETIVOS

### 5.1 *Objetivo General*

Evaluar el efecto quimioprotector de la decocción de la raíz de la *Jatropha dioica*, sobre la genotoxicidad inducida por tres mutágenos, mediante el SCGE en ratones albinos suizos cepa ICR.

### 5.2 *Objetivos Específicos*

1. Evaluar la capacidad quimioprotectora de la DJD como inhibidor del efecto genotóxico de la CF agente alquilante indirecto.
2. Evaluar la capacidad quimioprotectora de la DJD como inhibidor del estrés oxidativo mediante la inducción de daño genotóxico con DAUNO.
3. Evaluar la capacidad quimioprotectora de la DJD como inhibidor de la alquilación directa del DNA inducida con MMS.
4. Determinar si el efecto quimioprotector de la DJD es dosis dependiente.
5. Establecer la cinética del daño y reparación mediante la evaluación de la integridad del DNA con la prueba del EC.
6. Determinar contra que agente genotóxico se obtuvo mayor efecto quimioprotector.

## VI MATERIAL Y MÉTODO

### *6.1 Sustancias químicas*

#### *6.1.1 Ciclofosfamida (Cryofaxol Mr).*

Solución inyectable, Cada frasco ampola con liofilizado contiene: CF monohidratada equivalente a 200 mg y 500 mg de CF. Se utilizó como control positivo y agente inductor de daño en las pruebas relacionadas con los posibles efectos protectores.

#### *6.1.2 Daunorrubicina (Rubilem®)*

Liofilizado para solución inyectable (Clorhidrato de Daunorubicina, equivalente a 20mg de DAUNO). La DAUNO es secuestrada por los lisosomas de acuerdo con un mecanismo de separación en el tipo de pH. Es un fuerte inhibidor de la síntesis de DNA y RNA.

#### *6.1.3 Metilmetanosulfonato (129925) Aldrich 99%. No. Cas: 66-27-3.*

Agente alquilante directo, principal aductor de DNA, añade grupos metilo en el DNA en 7-guanina preferentemente, pero también en 3-adenina y 3-guanina.

## 6.2 Animales

Se utilizaron ratones albinos suizos cepa ICR (*Mus musculus*) adultos (mayores de 8 semanas de edad) con un peso aproximado de 25 a 30 g al comienzo de los experimentos, se utilizaron para la prueba del SCGE. Se obtuvieron del Bioterio del Instituto de Ciencias de la Salud (ICSa) de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo (UAEH), México. Se mantuvieron en jaulas de polipropileno, siguiendo las recomendaciones estándar para el cuidado de los animales establecidos en la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio, como: 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad, alimentación estándar para ratón y agua *ad libitum* y temperatura controlada de  $22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ . Los ratones se dividieron de manera aleatoria en lotes de 6 para cada tratamiento. Ver figura 11.



Figura 11. Manejo de ratones albinos suizos cepa ICR.

### 6.3 Material vegetal y preparación de la decocción

De la planta de *Jatropha dioica* se recolectaron las partes subterráneas durante el mes de Noviembre del 2010, así como una muestra de la misma con hojas y flores para su identificación durante el mes de Marzo del 2011, en la Colonia de Huitel, Mpio. de Tezontepec de Aldama, Hidalgo, México y, a una altitud de 1980 m. (Figura 12). La muestra fue autenticada por el M.C. Manuel González Ledesma, Profesor Investigador Titular A del Centro de Investigaciones Biológicas de la UAEH. Un ejemplar de la muestra se depositó en el herbario del Departamento de Ciencias Biológicas de la UAEH de Pachuca de Soto, Hgo.



Figura 12. Área de recolección de la *Jatropha dioica*. Coordenadas +20° 10' 23.51", -99° 16' 40.35"[4]

Para la preparación de la decocción, se utilizó solamente la parte subterránea de la planta; la raíz fue secada bajo sombra a temperatura ambiente, por aproximadamente 20 días. Posteriormente se trituró con un Molino para café y especias, Epices GX4100 semi-profesional con chuchillas de acero inoxidable y función pulso marca Krups para obtener fragmentos más pequeños. La decocción se preparó de acuerdo a las cantidades recomendadas en la MT, mediante el cocimiento de 1 g de la raíz seca triturada (equivalente a una pizca de raíz), sumergiéndola en 250 ml de agua purificada hirviendo y se dejó cocer por 15 minutos, con la finalidad de extraer sus principios activos. [130] Se filtró en una coladera plástica y posteriormente se almacenó en un frasco de vidrio inocuo con tapa, para su posterior administración como agua de uso. [15, 131]

#### 6.4 *Diseño experimental*

Para evaluar el efecto quimioprotector de la decocción de la raíz de la *J. dioica* (DJD) se utilizaron tres dosis diferentes: 14.88mg de plata/kg, para la dosis de decocción baja (DDB), 42.84mg de plata/kg, para la dosis de decocción media (DDM) y 85.68mg de plata/kg, para la dosis de decocción alta (DDA), administrados v. o. con una cánula intragástrica. Estas dosis se basan en lo equivalente al consumo de 250 ml (1 Taza), 750 ml y 1.5 litros de té, en relación al consumo de agua recomendado para una persona adulta de aproximadamente 70Kg.[131] Los agentes genotóxicos se administraron v. ip., posterior a la administración de la decocción, en las siguientes dosis: Ciclofosfamida 50mg/Kg, Daunorrubicina 10mg/Kg y Metilmetanosulfonato 40mg/Kg.

Los ratones se pesaron, marcaron y distribuyeron en lotes de 6 aleatoriamente. Para cada agente genotóxico se utilizaron: 1 Grupo testigo negativo, al que se le administró agua purificada v. o., 2 Grupos control positivos, al 1<sup>a</sup> se le administró el mutágeno y al 2<sup>a</sup> se le administró la DJD a dosis máxima 21.42 ml/Kg v. o. y tres grupos de experimentación a los que se les administró el agente mutágeno y la DJD en sus tres diferentes dosis ver tabla 2.

Tabla 2. Distribución de grupos de experimentación.

Grupo Testigo Agua	Grupo control 1 DJD	Grupo Control 2 Mutágeno	Grupo tratamiento 1 Mutágeno + DDB	Grupo tratamiento 2 Mutágeno + DDM	Grupo tratamiento 3 Mutágeno + DDA
21.42ml/Kg V. o.	85.68mg/Kg V.o.	CF 50mg/Kg V. i. p.	50mg/Kg V. i. p. + 14.88mg/Kg V.o.	50mg/Kg V. i. p. + 42.84mg/Kg V.o.	50mg/Kg V. i. p. + 85.68mg/Kg V.o.
21.42ml/Kg V. o.	85.68mg/Kg V.o.	DAUNO 10mg/Kg V. i. p.	10mg/Kg V. i. p. + 14.88mg/Kg V.o.	10mg/Kg V. i. p. + 42.84mg/Kg V.o.	10mg/Kg V. i. p. + 85.68mg/Kg V.o.
21.42ml/Kg V. o.	85.68mg/Kg V.o.	MMS 40mg/Kg V. i. p.	40mg/Kg V. i. p. + 14.88mg/Kg V.o.	40mg/Kg V. i. p. + 42.84mg/Kg V.o.	40mg/Kg V. i. p. + 85.68mg/Kg V.o.

CF: Ciclofosfamida, DAUNO: Daunorrubicina, MMS: Metilmetanosulfonato, DDB: Decocción dosis baja, DDM: Decocción dosis media y DDA: Decocción dosis alta

## 6.5 Ensayo cometa (SCGE)

### 6.5.1 Reactivos

1. PBS (libre de  $\text{Ca}^{++}$ ,  $\text{Mg}^{++}$ )
2. Solución Lisis (1000 ml)
3. Buffer de Electroforesis (300mM NaOH/1mM EDTA)
4. Neutralización del Buffer

### 6.5.2 Preparación para las muestras de una célula en gel

#### Procedimiento

1. Se prepararon 0.5% LMPA (250 mg/50ml) y 1.0% NMA (500mg/50ml) en PBS. Se colocaron en microondas cerca del punto de ebullición y se disolvió la agarosa. Para LMPA se prepararon alícuotas de 5ml de la muestra en tubos de ensayo y se refrigeraron hasta su uso. Cuando fue necesario se derritieron la agarosa en baño maría (37°C), se enfriaron y estabilizó la temperatura.
2. A las 3, 9, 15 y 21 horas de la administración de los compuestos, se sacrificaron los ratones por dislocación cervical y se disectó una porción del hígado, riñón y médula ósea, a los dos primeros se les retiró la túnica albugínea y se maceró el tejido con un poco de solución de PBS, dejando reposar la suspensión celular en hielo, después se removió y mezclaron 10  $\mu$  L de la suspensión de células por cada 75  $\mu$  L de LMPA.
3. Para la médula ósea: se extrajo un fémur, se limpió de tejido muscular y se cortaron ambas epífisis para descubrir los canales del hueso; se arrastró la médula con 0.5 ml de PBS recibiendo en un tubo Eppendorf; se conservó la muestra reposando en hielo.
4. Mientras la agarosa NMA está caliente, se sumergieron las laminillas hasta la mitad del área del esmerilado y se retiraron con cuidado, se limpió la parte inferior del portaobjeto para retirar la agarosa y se colocaron en una bandeja en una superficie plana,

para secarlas con calor seco en una estufa, hasta que se necesitaron; se evitó la humedad y se prepararon un día antes de su uso.

5. En la laminilla revestida se añadieron 75 $\mu$ L de LMPA mezclada con 10 $\mu$ L de células. Se colocaron en una bandeja de descanso con bolsas de hielo hasta que gelifico la capa de agarosa (3-5 min). El uso de 10.000 células en un área de 24x50mm. Los resultados que en una celda por campo microscópico a 200-250 x aumento.

6. Se deslizó cuidadosamente el cubreobjetos y se añadió un tercio de capa de agarosa (75 $\mu$ L de LMPA) a la muestra, se volvió a colocar el cubreobjetos y se regresó a la bandeja con hielo hasta que gelifico (3-5 min).

7. Se deslizó lentamente el cubreobjetos y se colocó en la solución de lisis recién hecha. Se protegió de la luz y refrigerero por lo menos 1 hora (las muestras se pueden conservar hasta 4 semanas en refrigeración sin solución de lisis porque afecta los resultados)

8. Después de al menos 1 hora a 4°C, se retiró suavemente el portaobjetos de la solución de lisis, los microgeles tratados con la solución de lisis se introdujeron en la cámara de electroforesis, cuidando que no quedaran espacios entre ellos.

9. Posteriormente se llenaron los depósitos de amortiguamiento con la solución de Buffer de electroforesis (pH>13), recién hecha hasta cubrir las laminillas.

10. Las laminillas se dejaron reposar en este regulador de daños en álcali-lábiles por 30 minutos.

Nota: Entre más larga sea la exposición al álcali, mayor es la expresión de los daños en sitios álcali-lábiles.

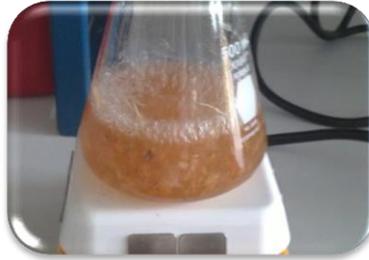
11. Se encendió la fuente de poder ajustándola a 300 mA y 22-23 voltios para realizar el corrimiento electroforético por 20 minutos.

12. Se apagó la fuente de poder para levantar suavemente las laminillas de la amortiguación y se colocaron en una cubeta de cristal, se cubrieron por goteo con la solución de neutralización, dejándola actuar por 5 minutos, repitiendo el proceso dos veces más.

13. Las laminillas se deshidrataron en metanol absoluto por 5 min, se secaron al aire y se almacenaron en un lugar seco para su posterior análisis.



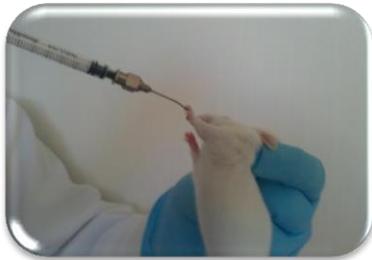
Preparación de reactivos



Preparación DJD



Manejo de ratones



Administración de mutágeno y DJD



Eutanacia  
• 3, 9, 15 y 21 hrs



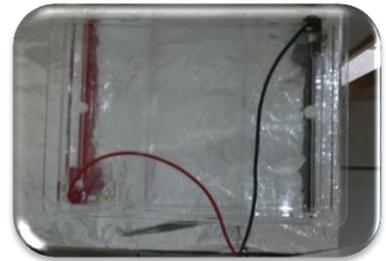
Disección de: hígado, riñón y médula ósea



Preparación de muestras en agarosa



Lisis  
• 4°C > 4 hrs



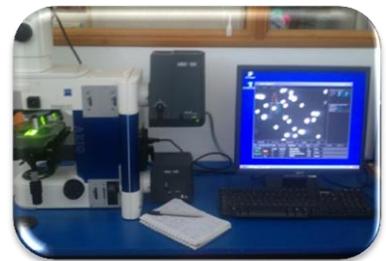
Corrimiento electroforetico  
• 300 mA, 23 V



Neutralización (pH 7) y deshidratación



Tinción  
• Bromuro de etidio



Análisis microscopico

Figura 13 Diagrama de metodología del Ensayo cometa.

### 6.5.3 Evaluación del daño del DNA

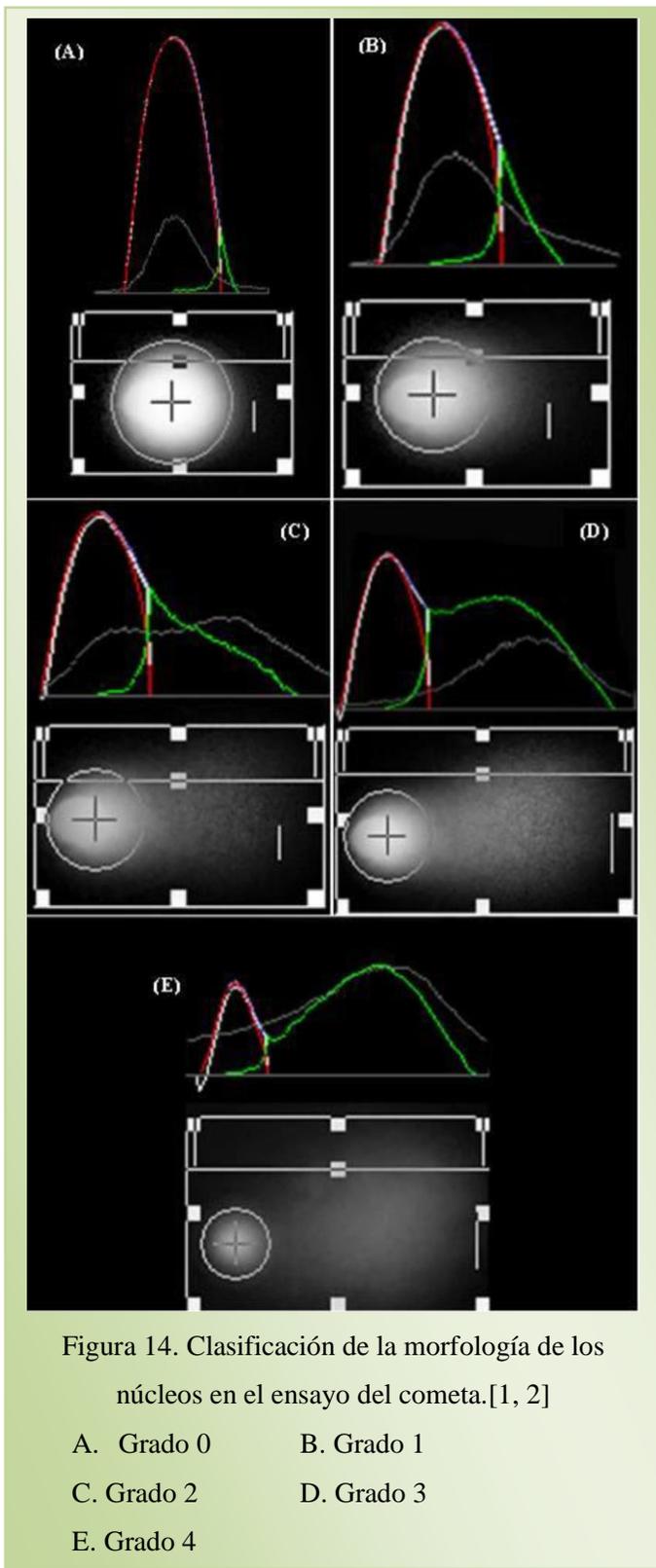
#### Procedimiento

1. Las laminillas se tiñeron con 50 µl de bromuro de etidio (Sigma) (0.02 mg/mL) expandiendo el colorante.
2. Para visualizar el daño en el DNA, se hicieron las observaciones con la ayuda de un Microscopio de epifluorescencia Axioimager (Zeiss Alemania) con el objetivo calibrado para todas las lecturas de 20x/0.65 seco, filtro de excitación 515-560 nm y filtro barrera de 590 nm. La imagen para cada célula fue capturada empleando el programa COMET 2.0. Se evaluaron 100 células por ratón, por órgano a las que se les evaluó:

1.1 Índice de daño (ID): es el grado de daño que presenten los núcleos, asignándoles valores del 0 al 4 de acuerdo a los criterios de la escala visual de la figura 14.

Con los datos obtenidos se calcularán los porcentajes obtenidos de la clasificación de grado de daño de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$I.D.= \# \text{ de núcleos grado } 0(0) + \# \text{ de núcleos grado } 1(1) + \# \text{ de núcleos grado } 2(2) + \# \text{ de núcleos grado } 3(3) + \# \text{ de núcleos grado } 4(4)$$



Microsoft Office Excel 2007.

1.2 Momento de la cola (TM): Definido como el porcentaje de DNA en la cola multiplicado por la longitud entre el centro de la cabeza y la cola, medido en unidades arbitrarias.

1.3 Longitud de la cola (TL): Longitud de migración del DNA, determinado por el analizador de imágenes medido en micrómetros ( $\mu\text{m}$ ).

### 6.6 Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó para el ID, la prueba no paramétrica de Wilcoxon; para TM y TL la prueba paramétrica de ANOVA y t de Student con corrección de Welch, Se estableció un intervalo de confianza (IC) del 95% y valor de  $P < 0.05$ , para definir y vincular la matriz nuclear. Para todos los análisis se utilizó el software estadístico GraphPad InStat V 3.1 y

## VII. RESULTADOS

### 7.1 Obtención de la raíz de la *Jatropha dioica*

En base a la información recabada bibliográficamente y en entrevistas, durante el periodo de Abril a Junio del 2010 se recorrieron algunas zonas del Valle del Mezquital en busca de la especie *Jatropha dioica*, encontrándose una gran población de la misma en el Municipio de Tezontepec de Aldama, bajo las coordenadas  $+20^{\circ} 10' 23.51''N$ , longitud  $-99^{\circ} 16' 40.35''O$ , altitud 6087m, donde se procedió a su identificación en primera instancia con ayuda de los pobladores del mismo lugar, se recolectó, un ejemplar el cual se envió al herbario del Centro de Investigaciones Biológicas (CIB) de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo (UAEH), donde el M. en C. Manuel Ledesma González confirmó la especie.

Posteriormente se llevó a cabo una segunda recolección durante el mes de Noviembre del 2010, a partir de las 12:00 pm a las 4:00 pm, el material vegetal recolectado se puso a secar bajo sombra, se cortó la parte área, se trituro con molino para especias con cuchillas de acero inoxidable, se estandarizo el peso para la preparación de la decocción (1g raíz/250ml Agua purificada) y se almaceno en un lugar seco y oscuro, para su posterior utilización. Los criterios para la selección de las dosis se basa en los valores de la  $DL_{50}$  encontrados.[131] Figura 15.

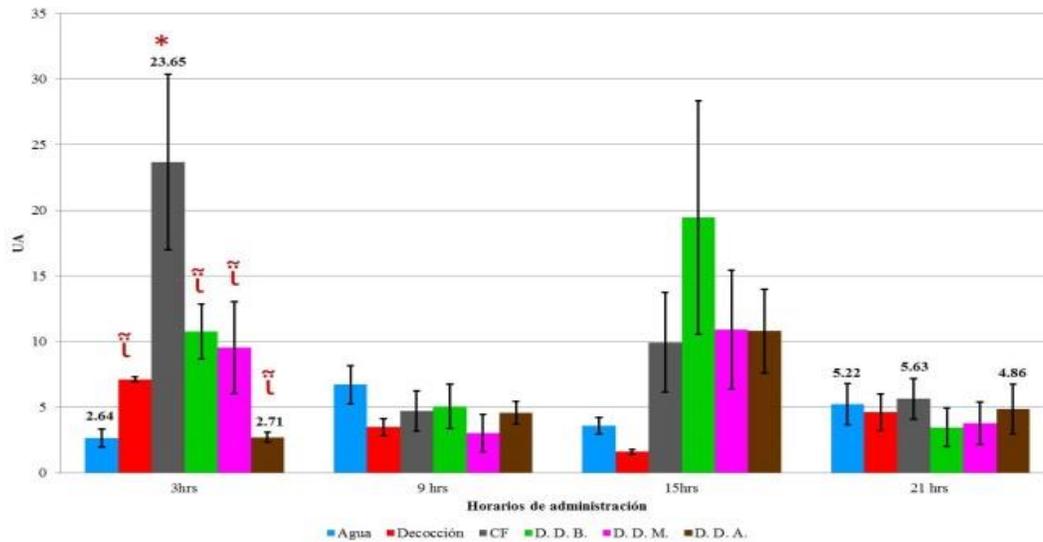


## 7.2 Ensayo cometa (SCGE)

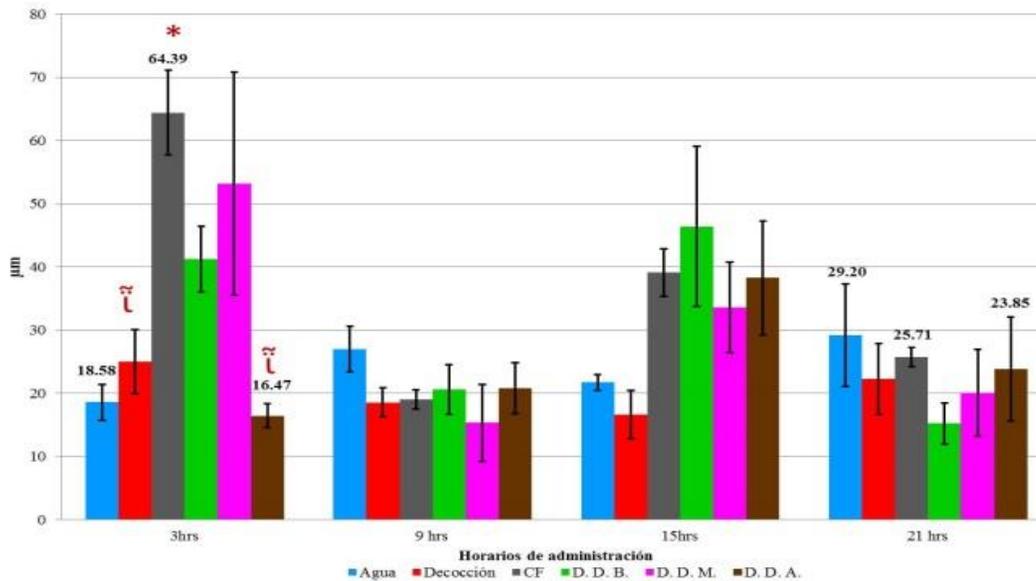
### 7.2.1 Efecto de la DJD mediante la inducción de daño con CF

#### 7.2.1.1 Hígado

**Gráfica 1. Momento de la cola de células del hígado tratadas con CF.**



**Gráfica 2. Longitud de la cola de células del hígado tratadas con CF.**



\* y † Diferencia significativa con el testigo negativo y con el control positivo respectivamente, de acuerdo a la Prueba t de Student, correspondiente a la  $p < 0.05$

**Tabla 3. Índice de daño de células del hígado tratadas con CF.**

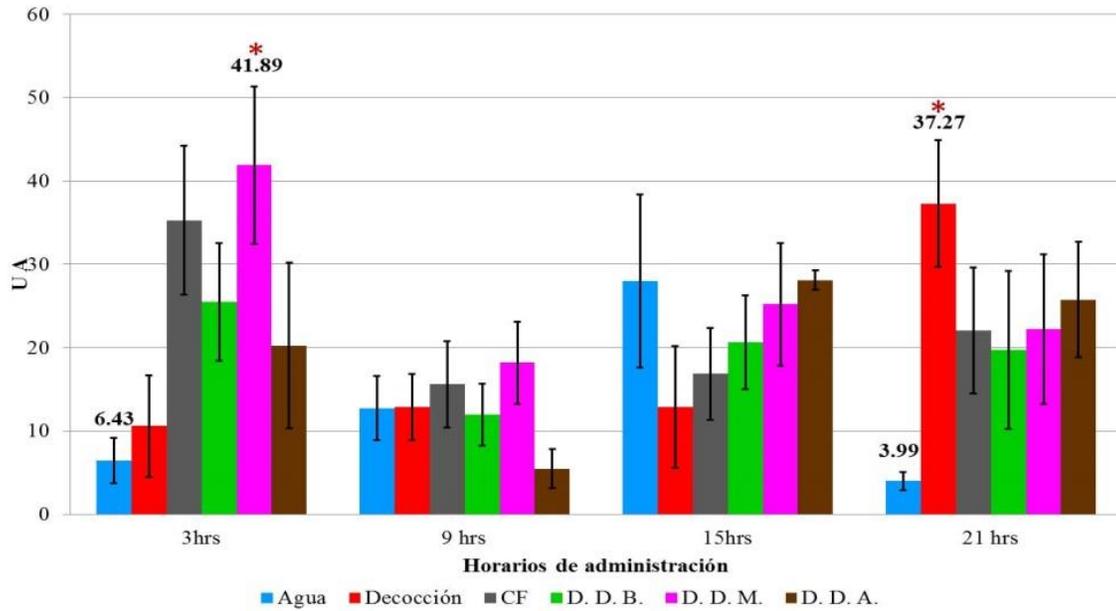
Clasificación de daño %	0	1	2	3	4	Índice de Daño y SEM	
	Sin daño 	Daño bajo 	Daño medio 	Daño alto 	Daño total 		
3 Horas	Agua	42%	44%	11%	3%	0%	70.00 ± 10.03
	Decocción	46%	31%	8%	6%	8%	92.00 ± 18.08 †
	CF	5%	4%	19%	34%	37%	315.20 ± 30.36 *
	DDB	4%	12%	42%	32%	10%	244.80 ± 17.87
	DDM	0%	3%	50%	30%	17%	267.00 ± 25.99 *
	DDA	14%	43%	23%	13%	7%	148.80 ± 29.57
9 Horas	Agua	21%	29%	19%	25%	6%	153.20 ± 17.86
	Decocción	31%	37%	9%	21%	2%	122.40 ± 11.37
	CF	31%	37%	15%	14%	4%	113.20 ± 16.64
	DDB	22%	46%	12%	20%	0%	129.00 ± 14.34
	DDM	31%	37%	19%	9%	4%	99.40 ± 29.65
	DDA	35%	34%	12%	16%	3%	112.40 ± 17.75
15 Horas	Agua	10%	53%	18%	17%	3%	128.20 ± 18.93
	Decocción	17%	47%	21%	11%	3%	116.00 ± 16.16
	CF	9%	34%	23%	27%	6%	182.00 ± 29.22
	DDB	12%	30%	26%	15%	18%	182.00 ± 23.79
	DDM	13%	26%	35%	16%	11%	171.20 ± 19.40
	DDA	21%	28%	19%	25%	6%	163.20 ± 34.25
21 Horas	Agua	20%	24%	33%	20%	4%	170.20 ± 33.71
	Decocción	17%	23%	36%	15%	9%	178.40 ± 28.86
	CF	18%	23%	30%	26%	3%	172.40 ± 18.36
	DDB	28%	25%	11%	22%	14%	178.00 ± 3.52
	DDM	15%	17%	27%	29%	12%	195.20 ± 41.86
	DDA	19%	11%	22%	36%	12%	210.00 ± 56.64

\* y † Diferencia significativa con el testigo negativo y con el control positivo respectivamente, de acuerdo a la Prueba de comparación múltiple de Kruskal-Wallis, correspondiente a la  $p < 0.05$

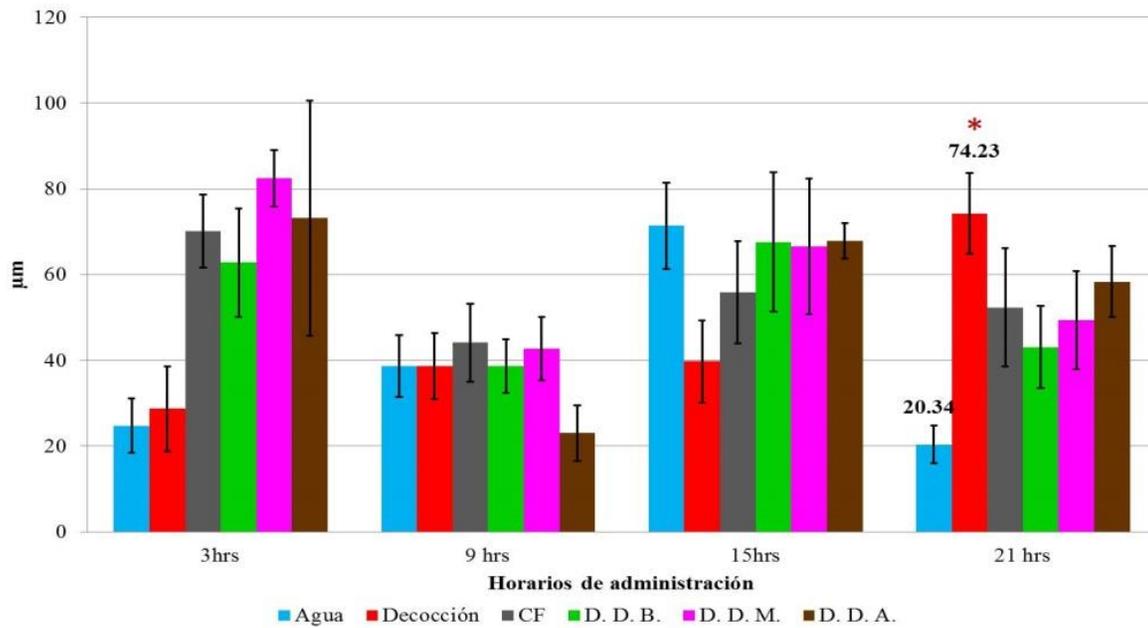
Los resultados obtenidos muestran el efecto genotóxico esperado inducido con CF en células del hígado, a partir de las 3 horas de su administración, mostrando valores de 23.65 u.a para TM, de 64.39  $\mu\text{m}$  para TL y el 71% con grado de daño alto y total de acuerdo al ID, valores estadísticamente significativos comparados con el testigo negativo. Se evidenció el efecto quimioprotector de la DJD, al reducir el daño genotóxico, con las tres dosis, siendo mayor el efecto con la DDA, de acuerdo al TM (2.71 u.a.), TL (16.47 $\mu\text{m}$ ) e ID (43% nucleoides con grado de daño bajo), a partir de las 3 horas de administración. A las 15 horas se observa un incremento en las rupturas al material genético sin diferencias estadísticamente significativas entre los grupos, el cual disminuye a las 21 horas, observando valores cercanos al testigo negativo.

### 7.2.1.2 Riñón

**Gráfica 3. Momento de la cola de células de riñón tratadas con CF.**



**Gráfica 4. Longitud de la cola de células de riñón tratadas con CF.**



\* y † Diferencia significativa con el testigo negativo y con el control positivo respectivamente, de acuerdo a la Prueba t de Student, correspondiente a la  $p < 0.05$

**Tabla 4. Índice de daño de células de riñón tratadas con CF.**

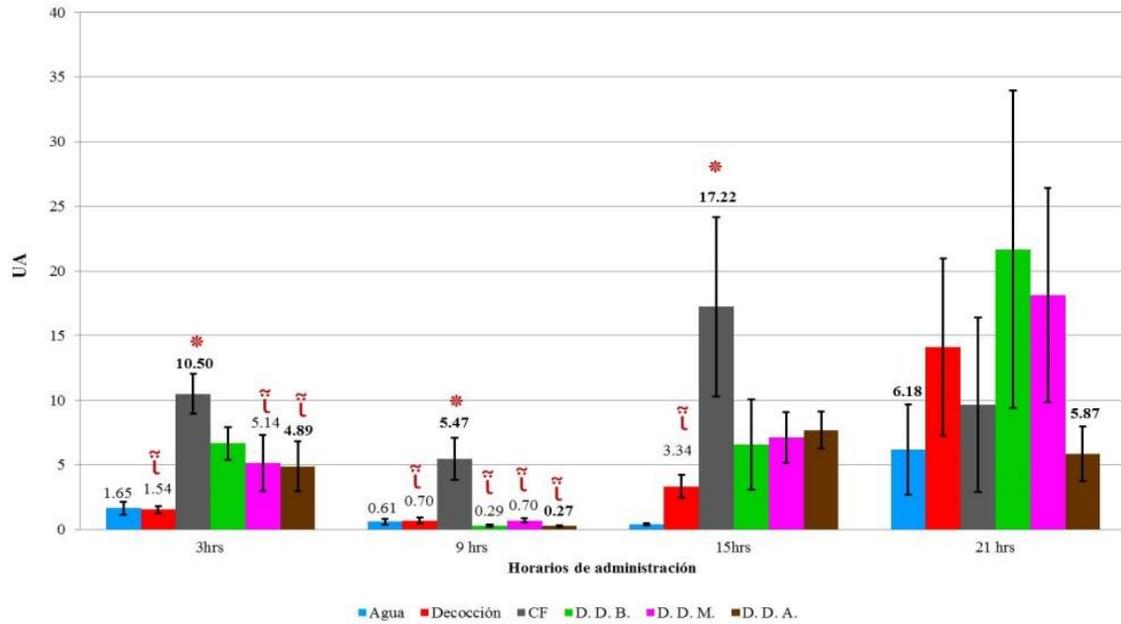
Clasificación de daño %	0	1	2	3	4	Índice de Daño y SEM	
	Sin daño	Daño bajo	Daño medio	Daño alto	Daño total		
3 Horas	Agua	53%	18%	10%	5%	15%	112.00 ±28.33
	Decocción	42%	26%	10%	16%	6%	107.20 ±35.39 <sup>ĩ</sup>
	CF	0%	7%	7%	49%	37%	326.00±14.20 *
	DDB	0%	4%	26%	49%	21%	291.60±20.87
	DDM	1%	2%	9%	64%	24%	311.00±7.58
9 Horas	DDA	10%	23%	11%	20%	36%	274.40±49.96
	Agua	12%	30%	13%	41%	4%	203.60±30.17
	Decocción	15%	26%	24%	29%	6%	182.40±19.27
	CF	11%	24%	15%	43%	7%	209.20±22.89
	DDB	8%	16%	42%	34%	0%	201.20±15.19
15 Horas	DDM	17%	20%	19%	42%	2%	199.60±27.81
	DDA	20%	41%	18%	19%	3%	143.20±29.57
	Agua	5%	10%	12%	65%	7%	260.40±21.42
	Decocción	10%	38%	5%	44%	4%	194.00±33.69
	CF	8%	19%	16%	47%	9%	233.80±34.02
21 Horas	DDB	4%	12%	17%	53%	13%	256.60±18.51
	DDM	9%	19%	12%	44%	17%	252.20±39.05
	DDA	11%	10%	19%	38%	22%	255.60±15.60
	Agua	15%	26%	34%	19%	6%	164.00±24.80
	Decocción	8%	11%	21%	35%	26%	257.20±16.94 *
21 Horas	CF	11%	16%	19%	40%	16%	238.40±37.58
	DDB	13%	12%	27%	22%	26%	238.00±25.05
	DDM	11%	18%	19%	48%	6%	238.40±27.43
21 Horas	DDA	9%	10%	11%	54%	16%	260.80±10.76

\* y <sup>ĩ</sup> Diferencia significativa con el testigo negativo y con el control positivo respectivamente, de acuerdo a la Prueba de comparación múltiple de Kruskal-Wallis, correspondiente a la p < 0.05

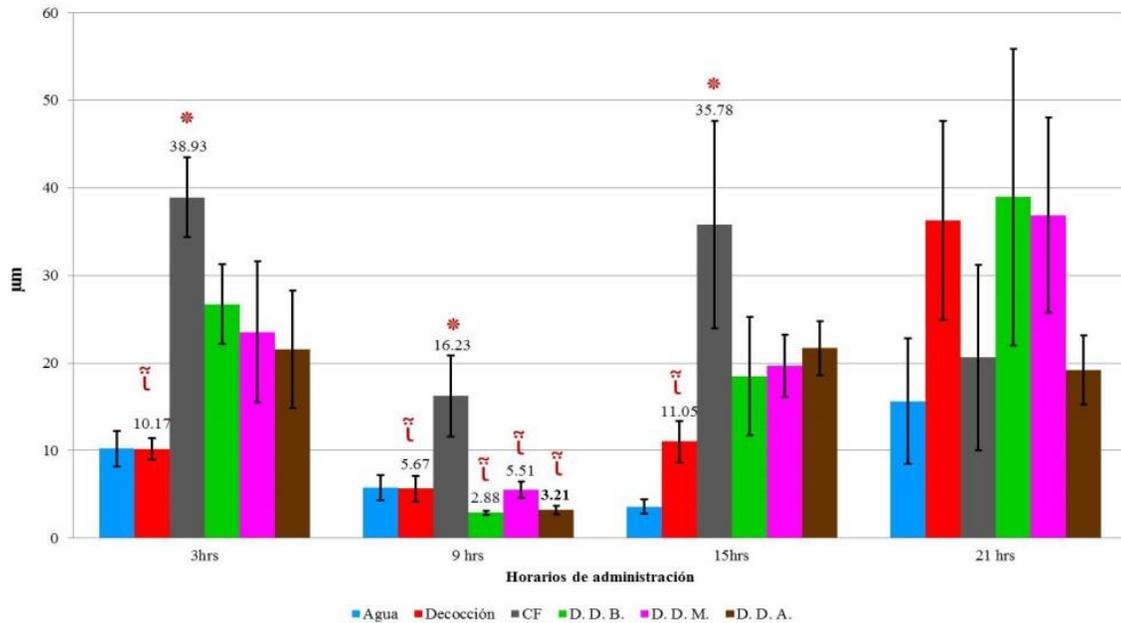
De acuerdo con los resultados obtenidos, no se observó efecto quimioprotector con ninguna dosis de la DJD, al contrario, se registró un incremento de daño al DNA en el grupo tratado con la DDM, de acuerdo con el TM a las 3 horas de la administración registrando una media de 41.89 u.a. y el 88% de los nucleoides con grado de daño alto y total. Resultados semejantes al control positivo. A las 21 horas se evidencio un incremento en las rupturas del DNA, en el grupo tratado con la DJD, registrando una media de 37.27 u.a. para TM, 74.23 μm para TL y el 61% de los nucleoides con grado de daño alto y total de acuerdo al ID.

### 7.2.3 Médula ósea

**Gráfica 5. Momento de la cola de células de Médula ósea tratadas con CF.**



**Gráfica 6. Longitud de la cola de células de Médula ósea tratadas con CF.**



\* y  $\bar{x}$  Diferencia significativa con el testigo negativo y con el control positivo respectivamente, de acuerdo a la Prueba t de Student, correspondiente a la  $p < 0.05$

**Tabla 5. Índice de daño de células de Médula ósea tratadas con CF.**

Clasificación de daño %	0	1	2	3	4	Índice de Daño y SEM	
	Sin daño 	Daño bajo 	Daño medio 	Daño alto 	Daño total 		
3 Horas	Agua	45%	35%	10%	6%	4%	85.60 ±11.526
	Decocción	52%	37%	3%	3%	5%	51.60 ±11.617 <sup>†</sup>
	CF	0%	12%	34%	42%	12%	254.20 ±16.327 *
	DDB	0%	20%	57%	20%	3%	208.20 ±16.16
	DDM	12%	26%	34%	22%	6%	180.00 ±36.359
	DDA	22%	29%	29%	17%	3%	158.00 ±32.119
9 Horas	Agua	0%	0%	0%	0%	0%	68.80 ±7.414
	Decocción	45%	38%	7%	10%	0%	70.80 ±7.455
	CF	41%	36%	6%	14%	3%	98.80 ±22.491
	DDB	53%	33%	9%	5%	0%	52.80 ±1.5 <sup>†</sup>
	DDM	52%	42%	3%	3%	0%	55.60 ±6.21
	DDA	49%	38%	7%	6%	0%	54.00 ±4.69
15 Horas	Agua	62%	36%	2%	0%	0%	37.20 ±5.535
	Decocción	41%	38%	6%	12%	2%	86.80 ±8.974
	CF	31%	28%	10%	24%	8%	143.00 ±20.926 *
	DDB	34%	31%	10%	20%	5%	113.20 ±21.565
	DDM	36%	27%	11%	17%	9%	132.00 ±10.206
	DDA	43%	24%	13%	17%	2%	111.00 ±9.803
21 Horas	Agua	34%	30%	15%	11%	10%	100.00 ±28.114
	Decocción	21%	21%	20%	25%	12%	179.20 ±33.756
	CF	42%	23%	11%	19%	4%	108.00 ±29.079
	DDB	29%	22%	14%	16%	19%	150.80 ±36.762
	DDM	22%	25%	12%	28%	12%	181.60 ±20.074
DDA	40%	25%	9%	22%	4%	116.80 ±17.281	

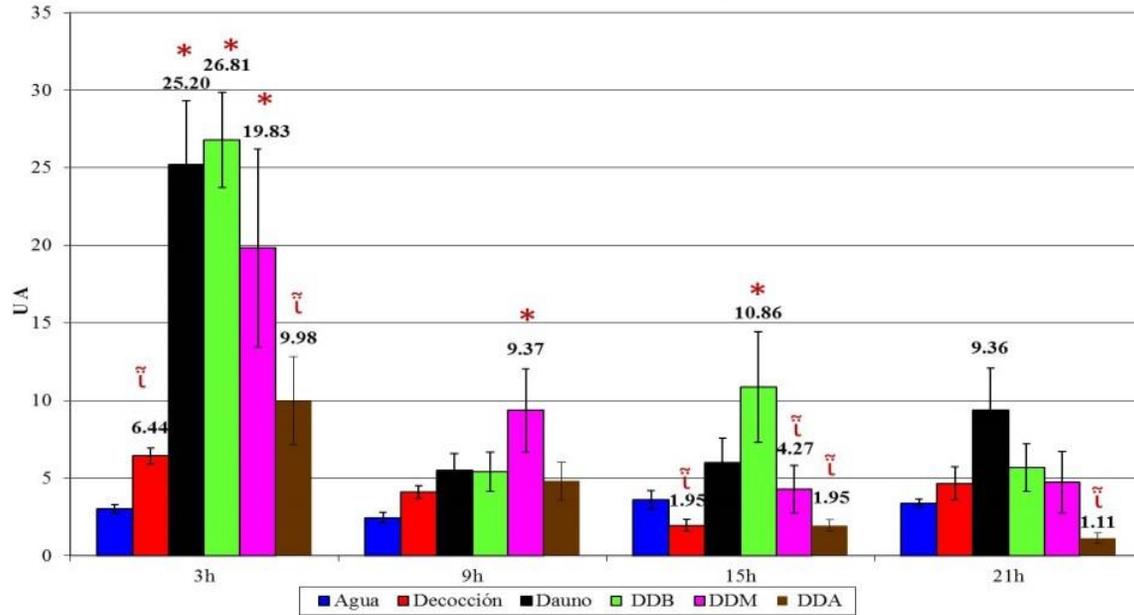
\* y <sup>†</sup> Diferencia significativa con el testigo negativo y con el control positivo respectivamente, de acuerdo a la Prueba de comparación múltiple de Kruskal-Wallis, correspondiente a la p < 0.05

Los resultados mostraron que las tres dosis de la DJD tienen efecto quimioprotector en células de Médula ósea, a las 3 y 9 horas posterior a su administración, de acuerdo con el TM, en el que se obtuvieron valores  $\leq 5.14$  y  $\leq 0.70$  u.a. en los horarios antes mencionados, con respecto a la TL de los cometas se obtuvieron valores  $\leq 5.51\mu\text{m}$  a las 9 horas y de acuerdo al ID, el efecto fue más evidente con la DDB donde el 53% de los nucleoides se observaron sin daño a las 9 horas. El mayor daño genotóxico se observó con la CF a las 15 horas posterior a su administración y a las 21 horas el grado de daño disminuye, donde la DDA exhibió valores similares al testigo negativo, sin embargo no son estadísticamente significativas.

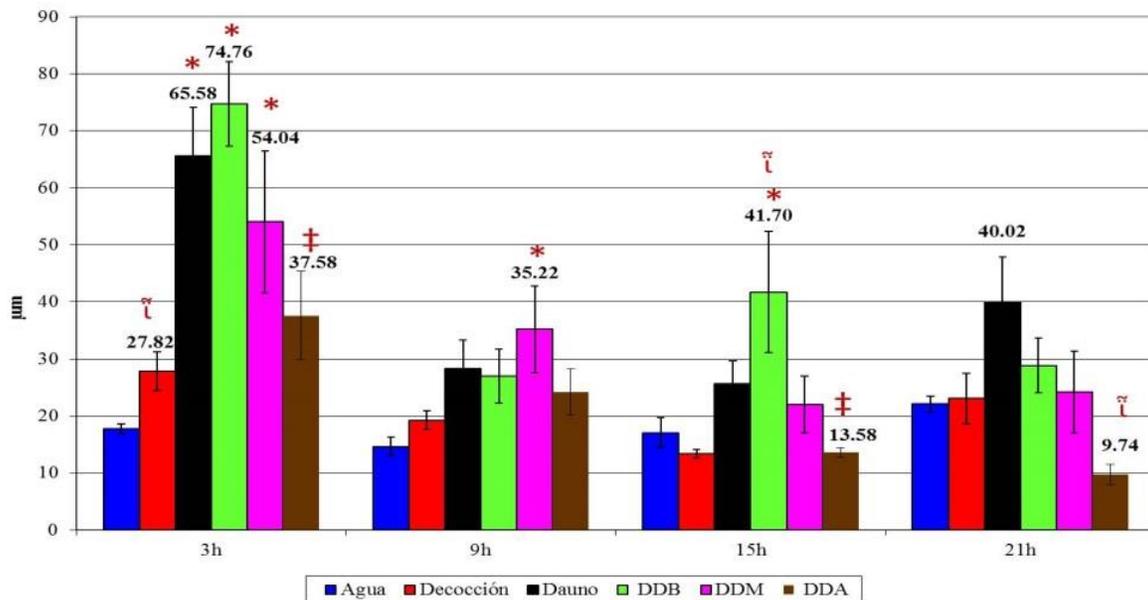
## 7.2.2 Efecto de la decocción mediante la inducción de daño con DAUNO

### 7.2.2.1 Hígado

Gráfica 7. Momento de la cola de células de hígado tratadas con DAUNO



Gráfica 8. Longitud de la cola de células de hígado tratadas con DAUNO



\* y † Diferencia significativa con el testigo negativo y con el control positivo respectivamente, ‡ con alguna de las dosis de la DJD de acuerdo a la Prueba t de Student, correspondiente a la  $p < 0.05$

**Tabla 6. Índice de daño de células de hígado tratadas con DAUNO.**

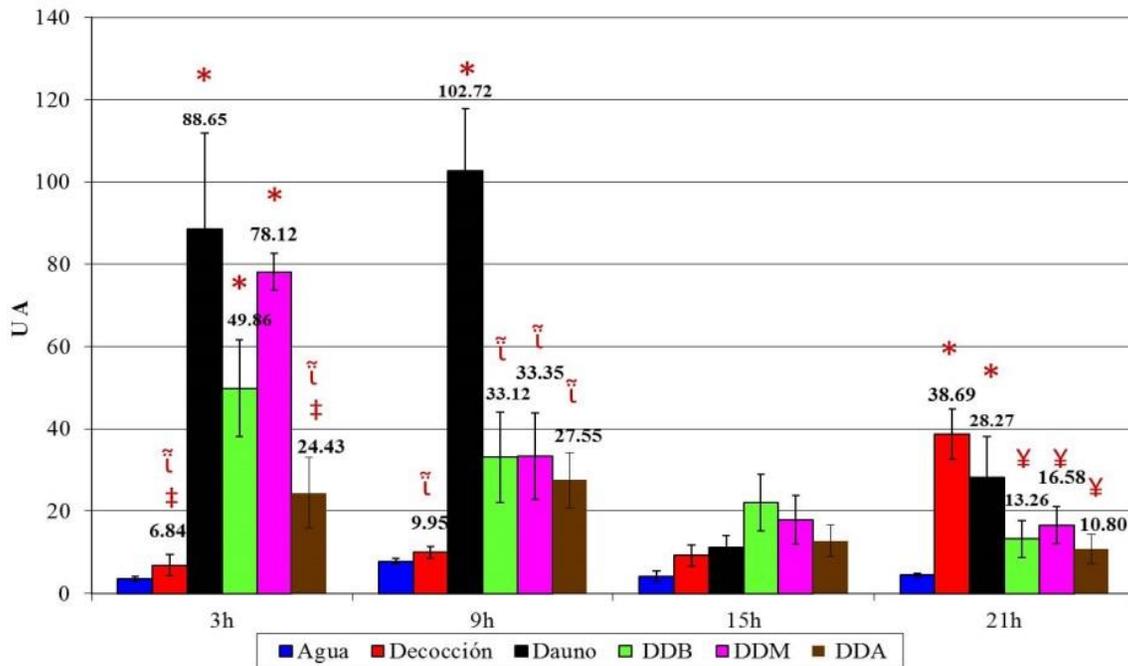
Clasificación de daño %	0	1	2	3	4	Índice de Daño y SEM	
	Sin daño	Daño bajo	Daño medio	Daño alto	Daño total		
3 Horas	Agua	34%	34%	17%	9%	6%	105.60 ±17.74
	Decocción	46%	31%	8%	6%	8%	92.00 ±19.38 † ‡
	DAUNO	7%	12%	14%	20%	47%	294.00 ±18.92 *
	DDB	3%	14%	17%	51%	15%	267.80 ±25.61 *
	DDM	11%	21%	21%	36%	11%	209.20 ±27.02
	DDA	11%	24%	30%	30%	6%	197.60 ±25.69
9 Horas	Agua	22%	40%	28%	5%	5%	126.00 ±12.17
	Decocción	31%	37%	9%	21%	2%	122.40 ±6.11
	DAUNO	5%	31%	29%	30%	5%	194.00 ±26.28
	DDB	11%	34%	35%	16%	4%	168.00 ±21.29
	DDM	5%	23%	42%	24%	6%	197.60 ±16.86
	DDA	8%	34%	43%	12%	3%	164.80 ±19.15
15 Horas	Agua	14%	50%	17%	17%	3%	140.00 ±21.04
	Decocción	17%	47%	21%	11%	3%	116.00 ±8.93 ‡
	DAUNO	20%	43%	19%	13%	4%	133.60 ±6.79
	DDB	7%	25%	37%	25%	6%	193.20 ±21.96
	DDM	17%	54%	17%	11%	2%	123.60 ±14.62
	DDA	19%	54%	19%	7%	2%	116.40 ±4.49 ‡
21 Horas	Agua	19%	41%	30%	9%	2%	130.40 ±13.11
	Decocción	17%	23%	36%	15%	9%	178.40 ±20.66
	DAUNO	8%	25%	40%	24%	4%	181.60 ±21.35
	DDB	8%	43%	27%	19%	2%	163.80 ±15.52
	DDM	13%	39%	33%	12%	2%	143.20 ±22.90
DDA	20%	68%	9%	3%	0%	91.60 ±8.77 † ‡	

\* y † Diferencia significativa con el testigo negativo y con el control positivo respectivamente, ‡ con alguna de las dosis de la DJD, de acuerdo a la Prueba de comparación múltiple de Kruskal-Wallis, correspondiente a la  $p < 0.05$

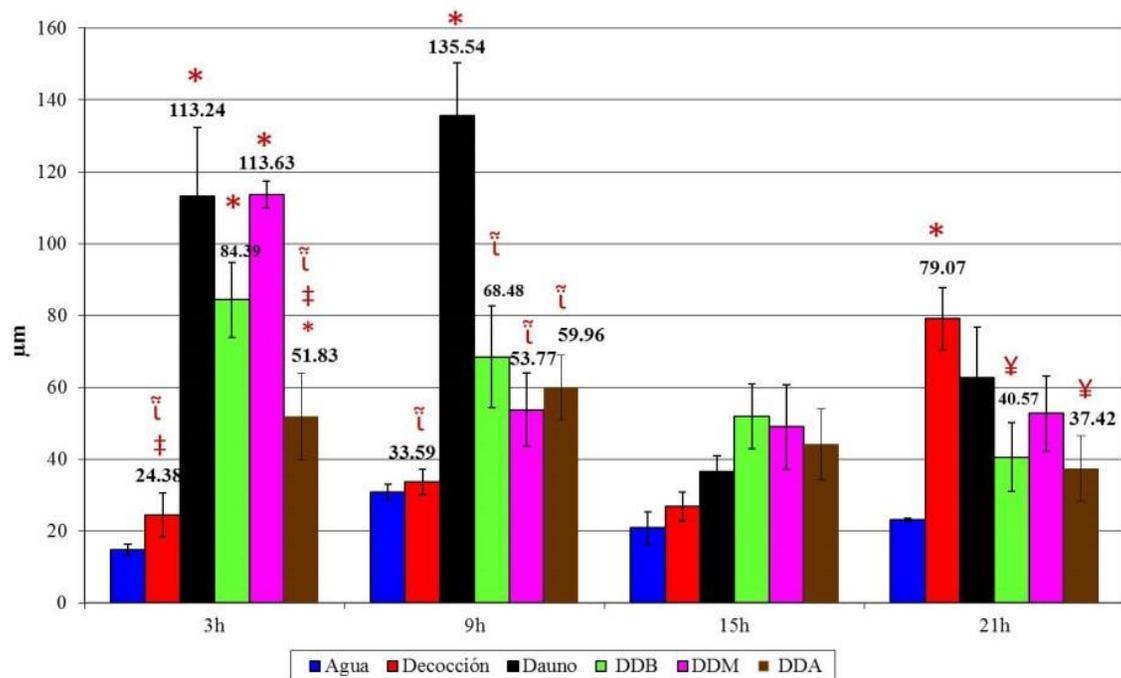
De acuerdo con los resultados obtenidos, se evidenció que la DJD tiene efecto quimioprotector en células del hígado, al disminuir el grado de daño inducido con la DAUNO, el efecto se observó a partir de las 3 horas de su administración de acuerdo con el TM (9.98 u.a.) y la TL (37.58  $\mu\text{m}$ ). En los horarios posteriores se observó la reducción en los tres parámetros evaluados, TM, TL e ID, en todos los grupos de experimentación, evidenciando nuevamente el efecto quimioprotector de la DJD a las 15 y 21 horas de acuerdo al TM, el cual mostro valores  $\leq 1.95$ , TL con valores  $\leq 13.58$  e ID con porcentajes de nucleoides de  $\geq 54\%$  con grado de daño bajo con la DDA.

## 7.2.2 Riñón

**Gráfica 9. Momento de la cola de células de riñón tratadas con DAUNO**



**Gráfica 10. Longitud de la cola de células de riñón tratadas con DAUNO**



\* y † Diferencia significativa con el testigo negativo y con el control positivo respectivamente, ‡ con alguna de las dosis de la DJD y ¥ con la DJD, de acuerdo a la Prueba t de Student, correspondiente a la  $p < 0.05$

**Tabla 7. Índice de daño de células de riñón tratadas con DAUNO.**

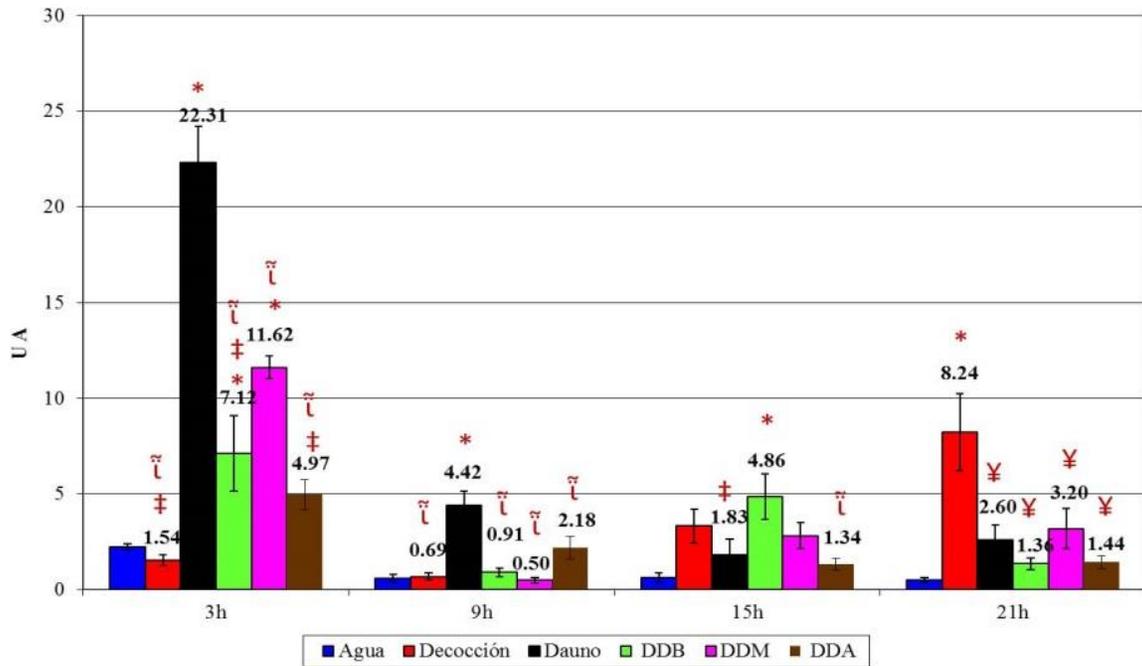
Clasificación de daño %	0	1	2	3	4	Índice de Daño y SEM	
	Sin daño	Daño bajo	Daño medio	Daño alto	Daño total		
3 Horas	Agua	44%	25%	16%	10%	5%	104.80 ± 20.34
	Decocción	42%	26%	10%	16%	6%	107.20 ± 33.49 $\ddagger$
	DAUNO	13%	11%	14%	16%	46%	284.40 ± 18.20 *
	DDB	3%	4%	15%	70%	7%	279.80 ± 4.28
	DDM	6%	15%	13%	40%	26%	267.20 ± 11.98 *
9 Horas	DDA	14%	12%	9%	25%	39%	262.80 ± 36.59
	Agua	12%	22%	33%	23%	9%	186.40 ± 13.41
	Decocción	15%	26%	24%	29%	6%	182.40 ± 11.43 $\ddagger$
	DAUNO	6%	17%	7%	48%	22%	276.40 ± 17.42 *
	DDB	2%	5%	18%	56%	19%	281.60 ± 16.86
15 Horas	DDM	3%	8%	18%	40%	31%	283.20 ± 16.50
	DDA	2%	8%	10%	62%	18%	276.20 ± 20.31
	Agua	21%	51%	18%	10%	0%	121.60 ± 17.82
	Decocción	10%	38%	5%	44%	4%	194.00 ± 32.91
	DAUNO	5%	22%	31%	36%	5%	209.60 ± 12.43
21 Horas	DDB	8%	11%	28%	47%	6%	229.60 ± 19.98 *
	DDM	5%	22%	36%	32%	5%	203.80 ± 20.71
	DDA	7%	23%	29%	33%	7%	209.60 ± 25.80
	Agua	9%	37%	41%	12%	2%	158.40 ± 7.11
	Decocción	8%	11%	21%	35%	26%	257.20 ± 20.00 *
DAUNO	9%	15%	20%	51%	5%	226.40 ± 19.83	
DDB	9%	22%	28%	38%	3%	212.00 ± 17.10	
DDM	13%	11%	23%	35%	17%	204.00 ± 17.50	
DDA	6%	31%	35%	22%	6%	180.40 ± 19.82	

\* y  $\ddagger$  Diferencia significativa con el testigo negativo y con el control positivo respectivamente,  $\ddagger$  con alguna de las dosis de la DJD y  $\ddagger$  con la DJD, de acuerdo a la Prueba de comparación múltiple de Kruskal-Wallis, correspondiente a la  $p < 0.05$

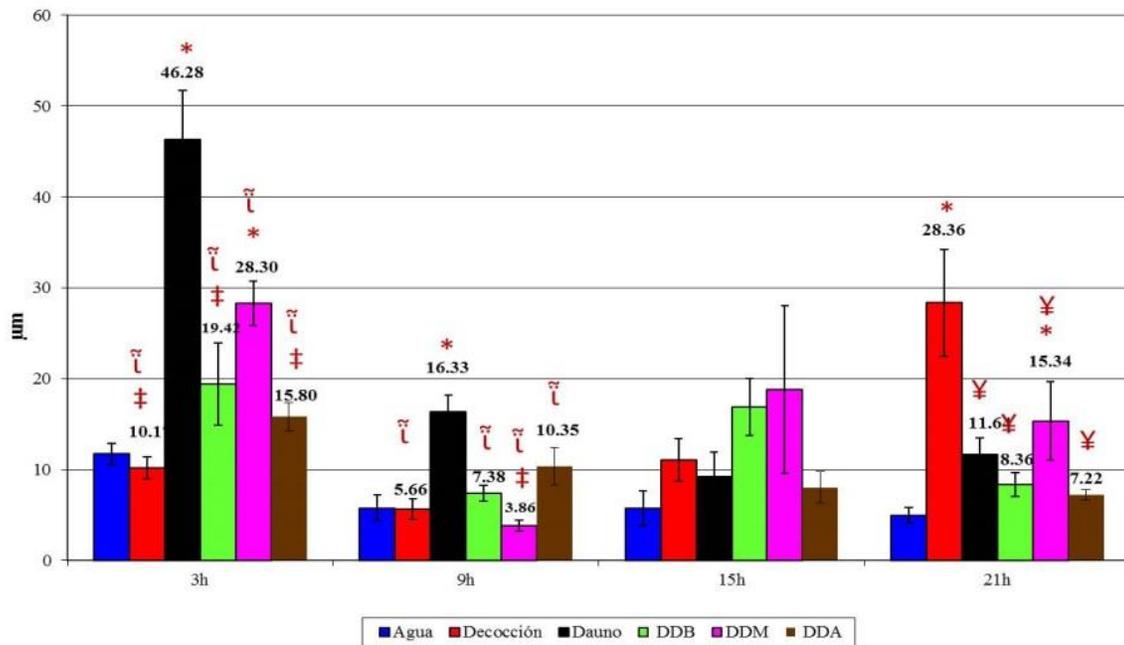
La DJD tiene efecto quimioprotector en células del riñón desde las 3 horas posteriores a su administración con la DDA de acuerdo a los valores obtenidos para el TM (24.43 u.a) y la TL (51.83 $\mu$ m). A las 9 horas el efecto genotóxico inducido por la DAUNO alcanza el mayor grado de daño y el efecto quimioprotector es evidente con las tres dosis de la DJD de acuerdo al TM, en el que se observaron valores  $\leq 33.35$  u.a y  $\leq 68.48\mu$ m para TL. A las 15 horas disminuyen los valores para TM y TL, sin diferencias estadísticamente significativas entre los grupos. A las 21 horas el consumo de la DJD presento mayor índice de rupturas de acuerdo al TM, TL e ID en los que se obtuvieron los siguientes resultados, 38.69 u.a., 79.07 $\mu$ m y 61% de nucleoides con grado de daño alto y total. La DDB y DDA reduce el daño en comparación con la DJD.

### 7.2.3 Médula ósea

Gráfica 11. Momento de la cola de células de Médula ósea tratadas con DAUNO



Gráfica 12. Longitud de la cola de células de Médula ósea tratadas con DAUNO



\* y  $\tilde{\sim}$  Diferencia significativa con el testigo negativo y con el control positivo respectivamente,  $\ddagger$  con alguna de las dosis de la DJD y  $\yen$  con la DJD, de acuerdo a la Prueba t de Student, correspondiente a la  $p < 0.05$

**Tabla 8. Índice de daño de células de Médula ósea tratadas con DAUNO.**

Clasificación de daño %	0	1	2	3	4	Índice de Daño y SEM	
	Sin daño	Daño bajo	Daño medio	Daño alto	Daño total		
3 Horas	Agua	44%	29%	10%	13%	4%	91.20 ± 11.32
	Decocción	52%	37%	3%	3%	5%	51.60 ± 11.62 †‡
	DAUNO	29%	31%	15%	7%	18%	144.80 ± 18.81 *
	DDB	42%	33%	7%	11%	7%	98.60 ± 18.77
	DDM	28%	32%	13%	22%	5%	144.40 ± 9.75
	DDA	27%	40%	11%	17%	5%	130.20 ± 5.71 †
9 Horas	Agua	54%	36%	5%	4%	0%	56.40 ± 7.41
	Decocción	45%	38%	7%	10%	0%	70.80 ± 7.71 †
	DAUNO	32%	49%	11%	6%	2%	84.40 ± 8.06 *
	DDB	30%	45%	14%	11%	0%	102.00 ± 6.62
	DDM	39%	42%	7%	12%	0%	89.60 ± 12.30 †
	DDA	38%	28%	10%	19%	6%	113.60 ± 10.81
15 Horas	Agua	51%	39%	7%	2%	0%	53.80 ± 6.44
	Decocción	41%	38%	6%	12%	2%	86.80 ± 9.13
	DAUNO	42%	33%	11%	13%	0%	83.60 ± 10.91
	DDB	46%	27%	14%	13%	1%	96.00 ± 9.42 *
	DDM	38%	36%	8%	16%	1%	103.40 ± 7.47
	DDA	55%	24%	5%	15%	0%	73.80 ± 9.60
21 Horas	Agua	48%	41%	8%	2%	0%	57.20 ± 6.28
	Decocción	21%	21%	20%	25%	12%	179.20 ± 27.87 *
	DAUNO	42%	36%	5%	13%	4%	91.60 ± 3.97
	DDB	41%	48%	8%	3%	0%	73.60 ± 7.66
	DDM	42%	31%	9%	18%	0%	101.60 ± 17.34
DDA	44%	47%	5%	5%	0%	65.60 ± 5.31	

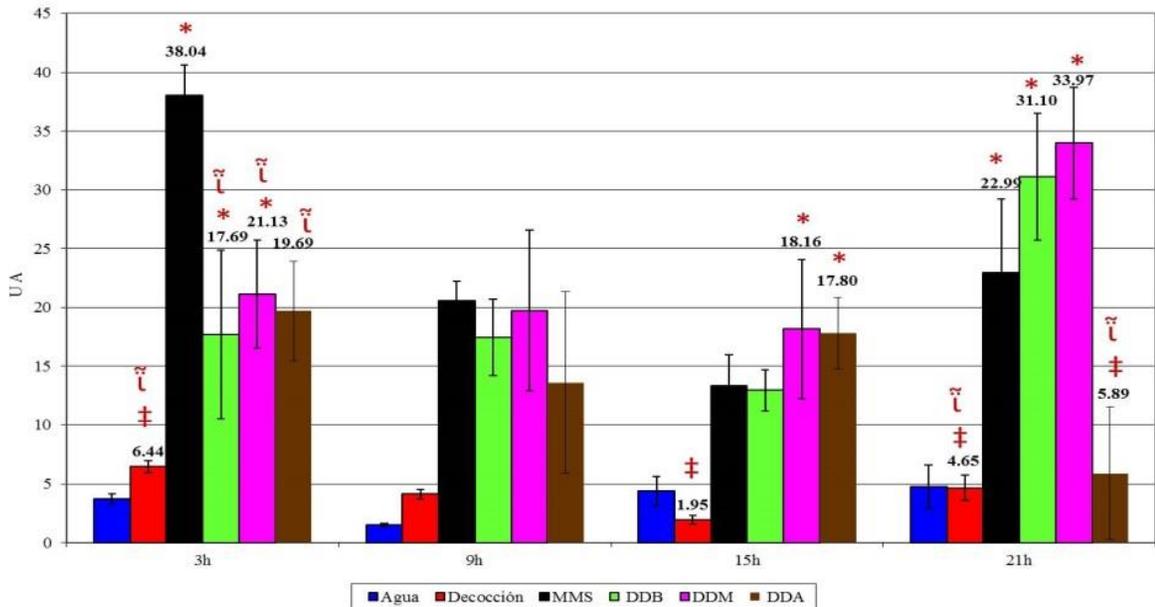
\* y † Diferencia significativa con el testigo negativo y con el control positivo respectivamente, ‡ con alguna de las dosis de la DJD y ¥ con la DJD, de acuerdo a la Prueba de comparación múltiple de Kruskal-Wallis correspondiente a la  $p < 0.05$

Los resultados muestran el efecto quimioprotector de la DJD con las tres dosis, desde las 3 horas posteriores a su administración en células de la médula ósea, reduciendo de manera significativa el daño inducido por la DAUNO, el mayor efecto se observó con la DDA de acuerdo al TM de 4.97 u.a., a la TL de 15.80µm e ID con el 40% de nucleoides con grado de daño bajo. A las 9 horas el efecto sigue siendo evidente con las tres dosis de la DJD, donde los valores para el TM fueron  $\leq 2.18$ , de TL fueron  $\leq 10.35$  y para ID  $\geq 66\%$  de los nucleoides se clasificaron sin grado de daño y con bajo daño. A las 15 horas se mantiene el efecto con la DDA de acuerdo al TM de 1.34 u.a., con una TL  $< 8 \mu\text{m}$  y con el 55% de nucleoides sin grado de daño de acuerdo al ID. A las 21 horas hay un incremento en las rupturas y migración del DNA en el grupo tratado solo con la DJD, y con la DDM, los demás grupos de experimentación se mantienen con valores bajos, cercanos al testigo negativo.

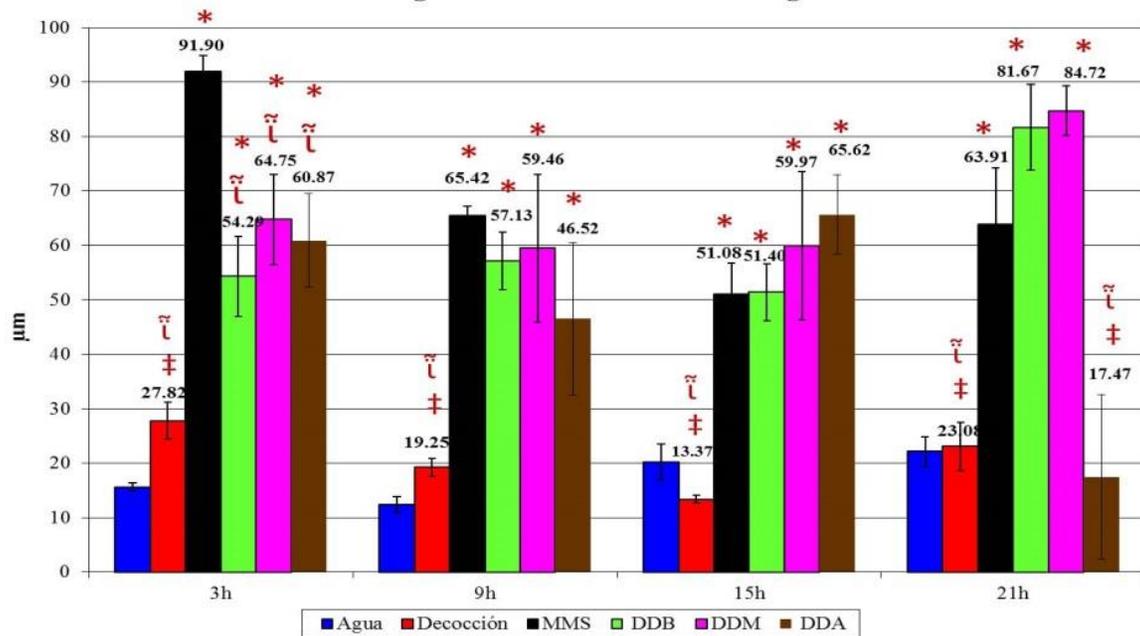
## 7.3 Efecto de la decocción mediante la inducción de daño con MMS

### 7.3.1 Hígado

Gráfica 13. Momento de la cola de células de hígado tratadas con MMS



Gráfica 14. Longitud de la cola de células de hígado tratadas con MMS



\* y † Diferencia significativa con el testigo negativo y con el control positivo respectivamente, ‡ con alguna de las dosis de la DJD y ¥ con la DJD, de acuerdo a la Prueba t de Student, correspondiente a la  $p < 0.05$

**Tabla 9. Índice de daño de células de hígado tratadas con MMS.**

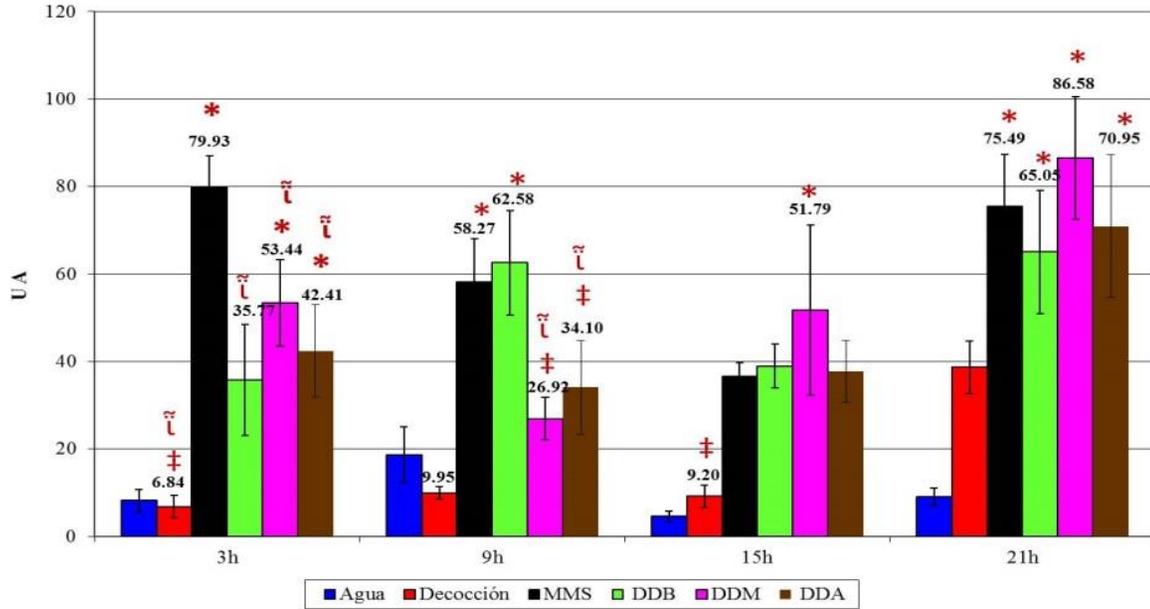
Clasificación de daño %	0	1	2	3	4	Índice de Daño y SEM	
	Sin daño	Daño bajo	Daño medio	Daño alto	Daño total		
3 Horas	Agua	36%	28%	17%	11%	7%	122.40 ± 7.31
	Decocción	46%	31%	8%	6%	8%	92.00 ± 19.38 ‡
	MMS	1%	73%	22%	3%	1%	127.40 ± 6.68 ‡
	DDB	0%	6%	65%	26%	3%	226.40 ± 8.33
	DDM	0%	2%	63%	32%	3%	235.60 ± 12.81
	DDA	1%	3%	33%	61%	2%	262.80 ± 14.70 *
9 Horas	Agua	23%	63%	10%	4%	0%	94.00 ± 7.82
	Decocción	31%	37%	9%	21%	2%	122.40 ± 6.11
	MMS	0%	7%	52%	36%	5%	242.00 ± 4.94 *
	DDB	2%	7%	51%	40%	0%	236.40 ± 10.15 *
	DDM	2%	14%	46%	36%	2%	221.40 ± 17.79 *
	DDA	0%	27%	39%	28%	6%	203.60 ± 23.97
15 Horas	Agua	13%	53%	28%	6%	0%	125.20 ± 8.71
	Decocción	17%	47%	21%	11%	3%	116.00 ± 8.93 ‡
	MMS	4%	13%	58%	22%	4%	212.00 ± 9.27
	DDB	4%	20%	48%	24%	4%	207.20 ± 13.89
	DDM	14%	15%	35%	33%	3%	214.00 ± 33.11
	DDA	2%	8%	58%	27%	5%	228.00 ± 9.74
21 Horas	Agua	16%	52%	25%	7%	0%	123.20 ± 9.24
	Decocción	17%	23%	36%	15%	9%	178.40 ± 20.66
	MMS	1%	13%	33%	47%	5%	242.20 ± 19.20
	DDB	2%	5%	34%	57%	2%	254.40 ± 9.99 *
	DDM	1%	3%	37%	55%	3%	256.60 ± 4.65 *
	DDA	40%	18%	9%	32%	1%	81.60 ± 42.76

\* y ‡ Diferencia significativa con el testigo negativo y con el control positivo respectivamente, ‡ con alguna de las dosis de la DJD y ¥ con la DJD, de acuerdo a la Prueba de comparación múltiple de Kruskal-Wallis, correspondiente a la  $p < 0.05$

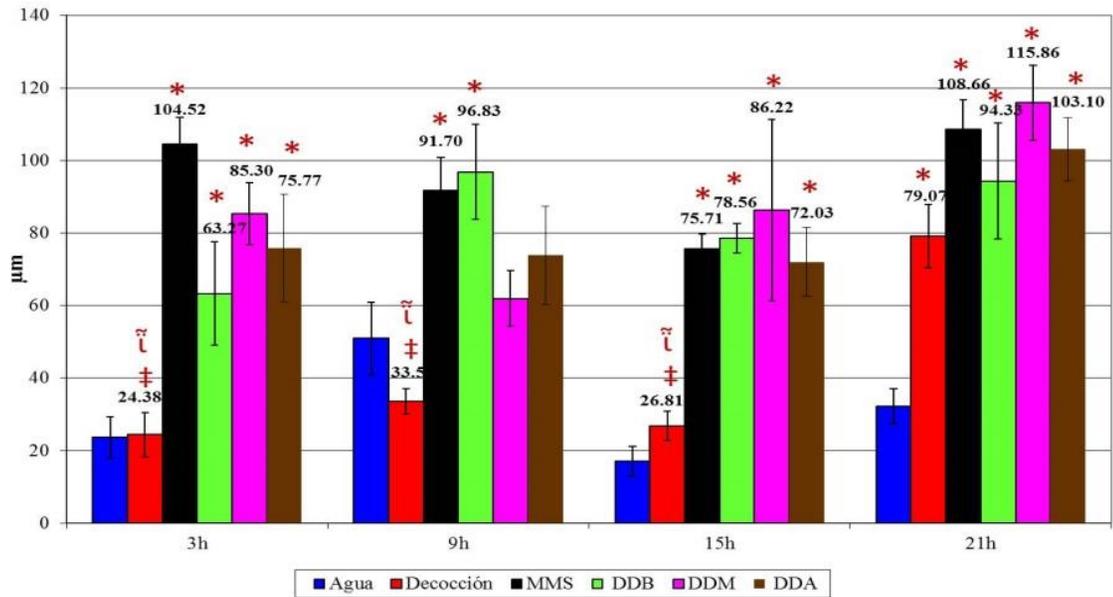
En células de hígado, a las que se les indujo daño genotóxico con DAUNO, la DJD demostró tener efecto quimioprotector con las tres dosis, a partir de las 3 horas posteriores a su administración, de acuerdo al TM, el cual registro valores  $\leq 21.13$  u.a., así como la TL con una migración del DNA  $\leq 64.75\mu\text{m}$ , no se observa efecto dosis dependiente, a pesar de que los valores más bajos corresponden a la DDB. De acuerdo con la evaluación de ID  $>$  del 60% de los nucleoides de los grupos de experimentación presentaron grado de daño medio y alto. A las 9 y 15 horas del daño provocado por el MMS es evidente, aunque muestra una disminución, tanto en el grupo control como en los grupos de experimentación. A las 21 horas solo la DDA mostró ser efectiva contra el daño provocado por el MMS de acuerdo a TM de 5.89 u.a., TL de 17.47  $\mu\text{m}$  e ID con el 40% de nucleoides sin daño.

### 7.3.2 Riñón

**Gráfica 15. Momento de la cola de células de riñón tratadas con MMS**



**Gráfica 16. Longitud de la cola de células de riñón tratadas con MMS**



\* y † Diferencia significativa con el testigo negativo y con el control positivo respectivamente, ‡ con alguna de las dosis de la DJD de acuerdo a la Prueba t de Student, correspondiente a la  $p < 0.05$

**Tabla 10. Índice de daño de células de riñón tratadas con MMS.**

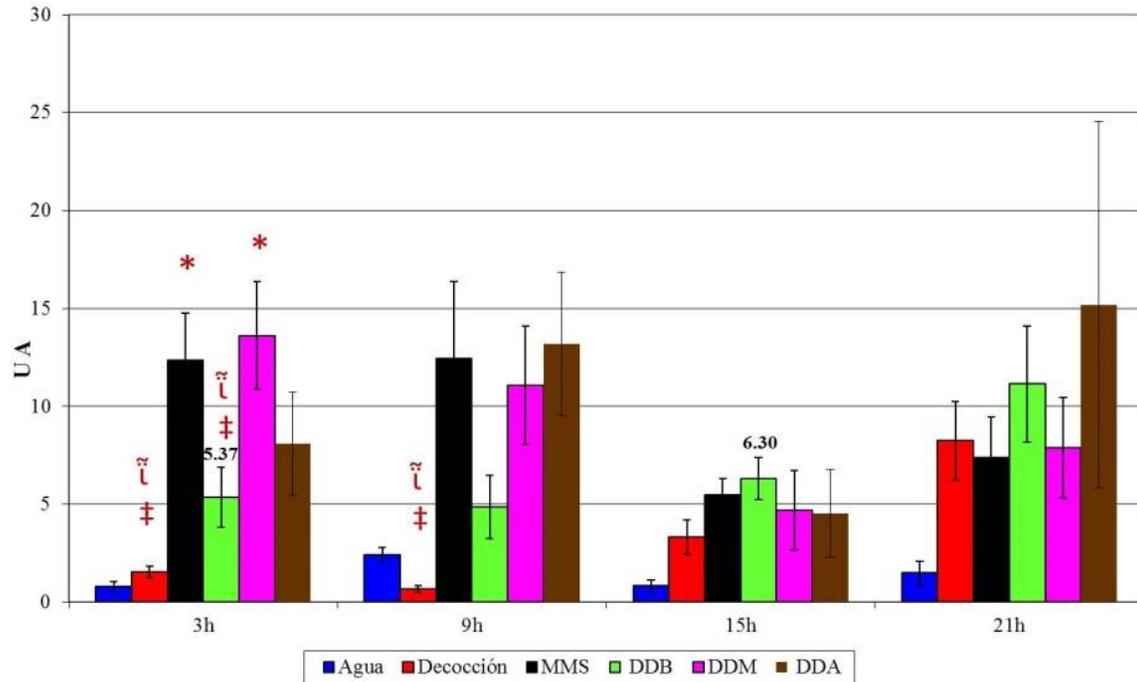
Clasificación de daño %	0	1	2	3	4	Índice de Daño y SEM	
	Sin daño	Daño bajo	Daño medio	Daño alto	Daño total		
3 Horas	Agua	20%	25%	26%	21%	8%	168.40 ± 27.94
	Decocción	42%	26%	10%	16%	6%	107.20 ± 33.49 ‡
	MMS	3%	48%	46%	2%	0%	148.20 ± 14.63
	DDB	9%	9%	21%	42%	19%	250.00 ± 30.93
	DDM	12%	2%	5%	80%	2%	286.80 ± 7.89
9 Horas	DDA	9%	7%	13%	68%	3%	254.40 ± 22.99
	Agua	10%	16%	35%	36%	2%	200.20 ± 20.11
	Decocción	15%	26%	24%	29%	6%	182.40 ± 11.43 ‡
	MMS	2%	12%	13%	55%	18%	270.40 ± 11.18
	DDB	2%	4%	27%	57%	11%	264.00 ± 21.52
15 Horas	DDM	2%	15%	31%	51%	1%	239.40 ± 15.30
	DDA	0%	12%	17%	68%	3%	264.00 ± 18.79
	Agua	30%	44%	17%	9%	0%	110.80 ± 22.04
	Decocción	10%	38%	5%	44%	4%	194.00 ± 32.91
	MMS	7%	7%	24%	58%	4%	258.40 ± 10.57 *
21 Horas	DDB	4%	8%	18%	65%	4%	262.00 ± 8.97 *
	DDM	6%	21%	20%	28%	25%	240.40 ± 38.60
	DDA	3%	20%	20%	50%	7%	232.40 ± 16.39
	Agua	13%	30%	38%	20%	0%	165.20 ± 14.83
	Decocción	8%	11%	21%	35%	26%	257.20 ± 20.00
21 Horas	MMS	2%	4%	11%	78%	5%	280.80 ± 6.97
	DDB	4%	20%	15%	57%	5%	244.40 ± 21.92
	DDM	3%	6%	13%	59%	19%	281.40 ± 6.68 *
	DDA	4%	4%	8%	82%	2%	280.40 ± 3.36

\* y ‡ Diferencia significativa con el testigo negativo y con el control positivo respectivamente, ‡ con alguna de las dosis de la DJD, de acuerdo a la Prueba de comparación múltiple de Kruskal-Wallis, correspondiente a la  $p < 0.05$

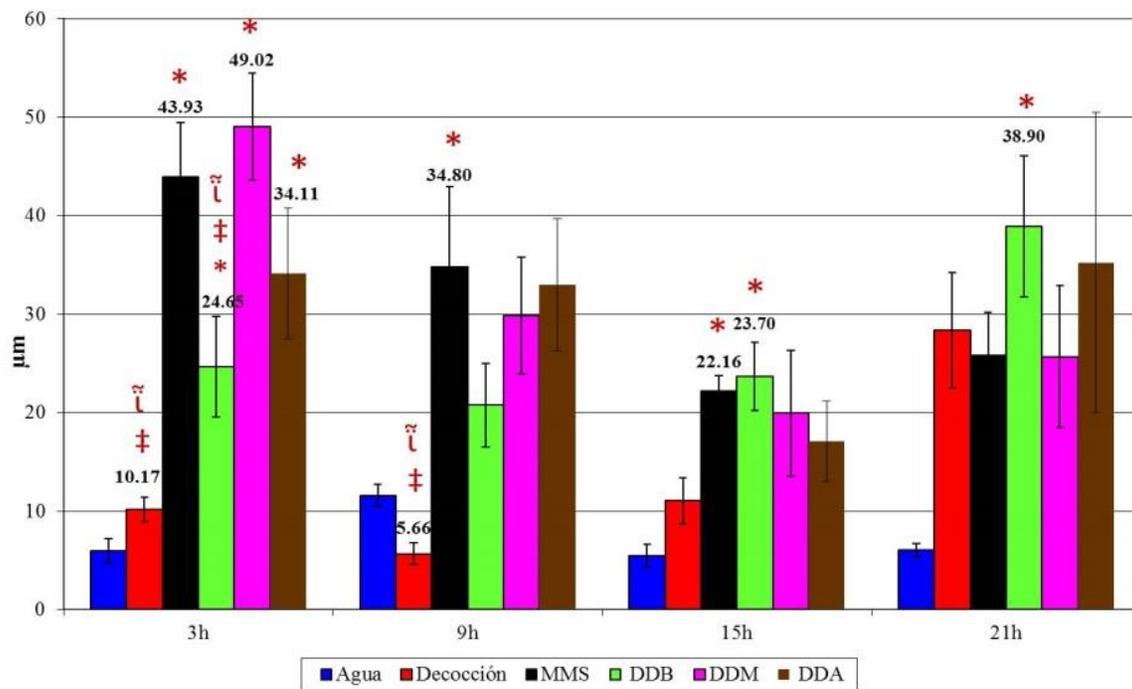
En células del riñón se observó efecto quimioprotector a las 3 horas de su administración con las tres dosis de acuerdo a los valores obtenidos para  $TM \leq 53.44$  u.a y a las 9 horas con la DDM y DDA, de acuerdo al TM de 26.97 y 34.10 u.a., respectivamente. El grado de daño inducido por el MMS más la DJD con las tres dosis, e incluso la administración de solo la DJD, mostraron elevado grado de daño en las células del riñón de acuerdo a los tres parámetros evaluados. Con respecto al ID en los grupos tratados con las tres dosis de la DJD, más del 50% de los nucleoides, se clasificaron con grado de daño alto.

### 7.4.3 Médula ósea

**Gráfica 17. Momento de la cola de células de médula ósea tratadas con MMS**



**Gráfica 18. Longitud de la cola de células de médula ósea tratadas con MMS**



\* y † Diferencia significativa con el testigo negativo y con el control positivo respectivamente, ‡ con alguna de las dosis de la DJD de acuerdo a la Prueba t de Student, correspondiente a la  $p < 0.05$

**Tabla 11. Índice de daño de células de médula ósea tratadas con MMS.**

Clasificación de daño %	0	1	2	3	4	Índice de Daño y SEM	
	Sin daño	Daño bajo	Daño medio	Daño alto	Daño total		
3 Horas	Agua	50%	31%	14%	4%	0%	70.80 ± 9.99
	Decocción	52%	37%	3%	3%	5%	51.60 ± 11.62 ‡
	MMS	7%	87%	5%	1%	0%	100.60 ± 3.04
	DDB	6%	39%	43%	10%	2%	159.20 ± 14.87
	DDM	0%	7%	41%	46%	6%	247.60 ± 12.86 *
	DDA	3%	25%	46%	26%	0%	199.20 ± 24.95
9 Horas	Agua	47%	35%	11%	7%	0%	76.40 ± 3.71
	Decocción	45%	38%	7%	10%	0%	70.80 ± 7.71 ‡
	MMS	3%	42%	28%	25%	2%	178.00 ± 15.53
	DDB	7%	57%	24%	10%	2%	137.60 ± 14.74
	DDM	10%	44%	23%	22%	2%	161.80 ± 16.56
	DDA	8%	51%	24%	17%	0%	157.60 ± 16.94
15 Horas	Agua	50%	43%	4%	4%	0%	55.20 ± 5.28
	Decocción	41%	38%	6%	12%	2%	86.80 ± 9.13
	MMS	14%	46%	23%	16%	0%	140.80 ± 7.86 *
	DDB	18%	48%	17%	15%	2%	131.60 ± 11.53 *
	DDM	19%	49%	24%	7%	0%	117.20 ± 15.45
	DDA	19%	53%	17%	7%	4%	109.60 ± 10.36
21 Horas	Agua	46%	47%	3%	2%	2%	57.60 ± 6.59
	Decocción	21%	21%	20%	25%	12%	179.20 ± 27.87
	MMS	11%	50%	22%	16%	0%	144.00 ± 12.70
	DDB	9%	39%	24%	23%	5%	169.60 ± 15.17 *
	DDM	16%	46%	22%	14%	2%	140.80 ± 23.11
	DDA	9%	41%	19%	28%	4%	166.60 ± 31.13

\* y ‡ Diferencia significativa con el testigo negativo y con el control positivo respectivamente, ‡ con alguna de las dosis de la DJD, de acuerdo a la Prueba de comparación múltiple de Kruskal-Wallis, correspondiente a la  $p < 0.05$

A las 3 horas fue evidente el efecto quimioprotector con la DDB en células de médula ósea con efecto genotóxico inducido por el MMS, en los horarios posteriores esta misma dosis la DDB, incrementa el número de rupturas y migración del DNA en células de médula ósea, de acuerdo a los valores obtenidos para TL los cuales van de los 23.70 – 38.90µm. y con aproximadamente el 86% de los nucleoides con grado de daño bajo, medio y alto.

## VIII DISCUSIÓN

Las plantas medicinales constituyen una fuente importante de fitoquímicos a los que se les atribuye propiedades protectoras contra enfermedades crónicas como el cáncer.[132] Se sostiene que los fitoquímicos naturales no sólo puede reducir los efectos secundarios adversos de las quimioterapias, también mejoran su eficacia, al disminuir su resistencia, reducir y aliviar los efectos secundarios tóxicos, reducir el riesgo de síndrome de lisis tumoral, y desintoxicar el cuerpo de agentes quimioterapéuticos.[133]

De acuerdo con Tenorio, 2012, en su estudio sobre el tamizaje fitoquímico de la *J. dioica*, revelo la presencia de alcaloides, flavonoides, triterpenos, esteroides, cumarinas y saponinas en la decocción de la raíz, determinando una  $DL_{50}$  mayor a 5,000 mg/kg, considerándose como no tóxica, de acuerdo con el método de Lorke, también se determinó su efecto citotóxico en el corto plazo, con las dosis media, 500ml y alta de la decocción 1000ml para un adulto de aproximadamente 70 Kg, así como un efecto genotóxico con la dosis alta al inicio del tratamiento de acuerdo al número de Eritrocitos policromáticos multinucleados (EPCMN)[131]. Recordemos que algunos diterpenos presentes en la *J. dioica*, han sido identificados como el Riolozatriona, con actividad antibiótica [134], la Citlalitriona, de efectos antitumorales *in vitro*[37], Jatropholona B, con acción gastroprotectora y actividad antiproliferativa[90],  $\beta$ -Jatrophona, con múltiples actividades biológicas entre ellas citotóxico, inhibidor de las células tumorales y actividad antitumoral *in vitro*, etc[89]; un esteral, el  $\beta$ -sitosterol, de actividad quimioprotectora y antioxidante [38] y un tatino, el Ácido elágico considerado antioxidante natural y anicarcinogénico[95].

Nuestro estudio evidenció la capacidad de la DJD para reducir el daño genotóxico inducido por CF, DAUNO y MMS, en células hepáticas, renales y de médula ósea de ratones albinos suizos cepa ICR, de acuerdo al ensayo cometa, versión alcalina, el cual ha sido propuesto por las agencias reguladoras para evaluar la genotoxicidad *in vivo*, por su efectividad detectar reparación así como un gran espectro de lesiones del DNA que incluyen rupturas, sitios abásicos, sitios álcali lábiles, aductos y estrés oxidativo[42].

### 8.1 Efecto quimioprotector ante el daño genotóxico con CF

La CF requiere de la activación de isoenzimas del CYP450 para expresar su capacidad alquilante, en su forma citotóxica, mostaza de fosforamida y acroleína, reactivo altamente electrofílico que provoca estrés oxidativo, tiene buena absorción oral y sus concentraciones plasmáticas máximas se logran a los 60 minutos de su administración[5]. Sin embargo existe la posibilidad de interacción con inhibidores o inductores del metabolismo hepático[107], [135].

De acuerdo con Arencibia Arrebola, *et al.*, 2010, es posible utilizar a la CF, para la inducción de daño en la estructura primaria del DNA, destacando dentro de sus efectos principales la formación de monoductos y enlaces cruzados entre cadenas, como resultado la aparición de rupturas por efecto de los mecanismos reparadores, los cuales manifiestan una determinada migración de DNA degradado al ser observado en el SCGE, es un fármaco viable para la implementación en ensayos de genotoxicidad, estrés oxidativo y efecto antigenotóxico de nuevas drogas *in vivo*. [111, 136].

En base a los resultados obtenidos en nuestro estudio pudimos inducir daño genotóxico en el grupo control tratado con CF, en los tres órganos evaluados hígado, riñón y médula ósea, alcanzando sus valores máximos 3 horas después de su administración, el cual difirió estadísticamente significativamente con testigo negativo, en el que se observaron valores <10 u.a para el TM, < 20µm para la TL y >50% de nucleoides sin grado de daño. Sin embargo en algunos casos es posible que se observe un ligero aumento de daños del ADN en los testigos negativos, tratados con agua purificada, el cual podría estar asociado con el estrés de la manipulación, por la administración con cánula y procedimiento de muestreo de órganos[137]. Podemos afirmar que estos resultados son indicadores aceptables para realizar el análisis contra los grupos de tratamiento.

El efecto quimioprotector de las tres dosis de la DJD, en células de hígado fue evidente a las 3 horas de su administración el cual se mantiene hasta las 21 horas. Es probable que la disminución del daño al DNA se deba a un efecto reparador de la DJD debido a la compleja mezcla de fitoquímicos presentes tales como: flavonoides, azúcares reductores, alcaloides y terpenos que pudieron haber modificado la tasa metabólica o la velocidad de eliminación de la CF, efecto similar al observado con los polifenoles, los cuales tienen un doble efecto sobre las enzimas de fase I como es el caso del jugo de naranja y del té verde, donde el [-]-epigallocatequina-3-galato, el cual se comporta como inhibidor de varias enzimas de fase I como los citocromos P450 (CYP450), el CYP1A, 2B1 y 2E18 y el ácido elálgico, o los limonoides, ambos actúan como inductores de enzimas fase II, de biotransformación, como las enzimas Glutación S transferasa (GSTs) y la nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NAD(P)H quinona reductasa [138]; Algunos flavonoides como la hesperetina, puede inhibir selectivamente la CYP450, la reducción de la absorción de la CF y favoreciendo la eliminación de sus metabolitos activos, afectando significativamente su toxicidad potencial[137].

En células de riñón se detectó un incremento en las rupturas al DNA con la DDM a las 3 horas de su administración y con la DJD a las 21 horas, lo cual surgirá la posibilidad de generación de metabolitos genotóxicos. Considerando que el riñón es el principal órgano de excreción y altamente susceptible a las lesiones tóxicas por una gran variedad de fármacos y químicos, como a los alcaloides, triterpenos, sesquiterpenos, saponinas, etc.[139] Es probable que a las 21 horas las células del riñón estén más expuestas a los metabolitos derivados de la DJD como alcaloides, triterpenos, sesquiterpenos o saponinas incrementando el daño al DNA.

El efecto quimioprotector en células de médula ósea, observado a partir de las 3 horas con la DDA hasta las 9 horas con las tres dosis de la DJD, probablemente se deba a la presencia de diterpenos y flavonoides ambos con capacidades antioxidantes, es probable que inhiban la inducción de radicales libres de manera eficiente como lo hace el flavonoide, naringina,

el cual es capaz de captar radicales libres hidroxilo y superóxido y peroxidación de lípido, también es capaz de elevar la catalasa, superóxido dismutasa y glutatión peroxidasa para la síntesis de ARNm, ejerciendo un efecto quimioprotector en las células de la médula ósea [140].

De acuerdo Hernández Romero J. 2011, en la prueba de MN, la DJD no mostró potencial genotóxico, pero si citotóxico al disminuir la relación entre eritrocitos policromáticos (EPC) y eritrocitos normo crómicos (ENC), efecto que se incrementa con la administración conjunta de CF, este efecto no es dependiente de la dosis, pues se observó con la DDM.[141] La ausencia de MN sugiere que el daño encontrado en el SCGE no fue convertido en un daño efectivo, es decir una mutación, donde el daño al DNA fue revertido por el sistema eficiente de reparación de las células.

Es necesario realizar más estudios, dado que se observa un incremento de daño al DNA de acuerdo a los parámetros evaluados a las 15 y 21 horas, y considerando la presencia de alcaloides en la DJD es necesario determinar si la cantidad, tipo y tiempo de exposición a este alcaloide es o no genotóxico, pues se sabe que algunos como el alcaloide sanguinarina, componente principal del aceite de *Argemone*, es altamente genotóxico, causando daño al ADN, en la sangre y células de médula ósea de ratones [142].

Se sabe que los polifenoles como la cúrcuma, el resveratrol, la genisteína, galato de epigallocatequina (EGCG), la silimarina, quercetina, emodina, y flavopiridol, todos tienen la capacidad probada para sensibilizar a las células tumorales, la mayoría se utilizan como agentes quimioterapéuticos, estos polifenoles ejercen sus efectos mediante la supresión de las actividades de varios importantes factores de transcripción como el Factor Nuclear kB (NF-kB) el Activador de Proteínas -1 (AP-1) que a su vez regulan otros genes. Aunque parece probable que estos fitoquímicos utilizan otras vías que por ahora siguen siendo desconocidas. [143]

A pesar de que nuestros resultados, mostraron que la DJD presenta actividad quimioprotectora en células de hígado y médula ósea, se sugiere realizar más estudios para explorar cuál de los compuestos de la DJD es el que muestra dicha actividad y evaluar su potencial terapéutico contra cáncer. Así como la evaluación de su efecto nefrotóxico mediante pruebas de función renal como medición de la urea, o bien evaluar la excreción de metabolitos genotóxicos mediante la prueba de Ames.

## 8.2 Efecto quimioprotector ante el daño genotóxico con DAUNO

Se eligió DAUNO porque es un agente genotóxico eficaz para el estudio de genotoxicidad *in vivo* e *in vitro*, una sola administración induce genotoxicidad en diversos tejidos en células normales [144]. Algunos de sus mecanismos de acción son: la intercalación del DNA, inhibición de la topoisomerasa II y la producción de radicales a través de una reducción de la quinona y estructuras de hidroquinona a semiquinona, que a su vez pueden formar superóxido y peróxido de hidrógeno, [145, 146], en el citoplasma, la mitocondria, el retículo endoplásmico y particularmente en el núcleo [147] lo que le confiere a la DAUNO su actividad antitumoral, por incremento en el estrés oxidativo celular [148].

Estudios genotóxicos con doxorubicina (DXR) a dosis de (5 µg/ml, 1 hora), indican que después de 48 horas del tratamiento no se detectan células con cometa, sugiriendo que la muerte celular ocurre en ausencia de fragmentación en el DNA. Probando la no implicación de la apoptosis en la muerte celular generada por DXR a la dosis de 5 µg/ml.[149]

Actualmente se evalúan combinaciones de antraciclinas (DAUNO y DXR) junto con antioxidantes dietéticos, como terapias para inhibir la generación de radicales libres y cardiotoxicidad, en nuestro estudio utilizamos DAUNO como control para determinar el posible efecto quimioprotector mediante actividad antioxidante de la DJD.

De acuerdo con Jagetia G. *et al.*, 2008, varios polifenoles modulan la quimiosensibilidad de células tumorales como: la genisteína, el resveratrol, la EGCG, la silimarina, emodina y el flavopiridol, al potenciar el efecto de antraciclinas como la DAUNO y la DXR, en células de cáncer de próstata, mama, páncreas y pulmón a través de varios mecanismos como la supresión de NF-kB, por arresto de la fase G1, inhibición de la activación de las caspasas, fragmentación de DNA y translocación del citocromo C inducido por peróxido de

hidrógeno o C2, también se sabe que sensibilizan células difusas de linfoma tratadas con CF y DAUNO, revierten la resistencia a multidroga por inhibición del flujo de salida de la DXR, aumentan el efecto antígenotóxico al incrementar el estrés oxidativo en células humanas B malignas, mediante la inducción de mayor producción de especies reactivas de Oxígeno (ROS), además de incrementar la apoptosis de las células tumorales. Existe evidencia de que la combinación de extracto de semilla de uva (GSE) en combinación con la DXR, mejoran el efecto, sobre el receptor positivo de MCF-7 y receptor negativo de MDA-MB 468 de células de cáncer en humanos, al detenerlos en fase G1.[44, 143]

Los terpenos, han sido reportados como agentes quimiopreventivos, Hernández C. *et al.*, 2002, determinaron el efecto inhibitorio dependiente de la dosis, del aceite esencial de manzanilla (CO) (*Matricaria camomila*) al evaluar los intercambios de cromátidas hermanas (SCEs) producidos por la DAUNO y Metilmetanosulfonato (MMS) en células de médula ósea de ratón, sugiriendo que el CO puede ser un antimutágeno eficaz posiblemente por su contenido en antioxidantes como el bisabolol y camazuleno, los cuales atrapan a los radicales libres formados durante la biotransformación de la DAUNO.[150]

En nuestro estudio, como era de esperarse, los ratones tratados con DAUNO mostraron mayor grado de daño de acuerdo al TM, T1 e ID. Se evidenció el efecto quimioprotector al DNA en hígado, riñón y médula ósea, con pequeñas diferencias en los efectos antígenotóxicos en los distintos tejidos.

En células de hígado, el efecto quimioprotector se observó con la DDA a partir de las 3 horas de su administración, a las 15 horas el efecto se observó con la DDM y DDA y a las 21 horas con la DDA.

En células del riñón, los valores para TM y TL, fueron mayores en comparación con los valores observados en células del hígado y medula ósea, a pesar de ello el efecto quimioprotector se observó a partir de las 3 horas con la DDA y en los horarios subsecuentes se evidencio con las tres dosis de la DJD.

En células de médula ósea, el efecto quimioprotector fue evidente con las tres dosis de la decocción a partir de las 3 horas, descendiendo los valores de migración del DNA en los horarios posteriores hasta mantenerse en valores cercanos al testigo negativo a las 21 horas.

Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Almeida *et al.*, 2012, al evaluar el efecto antigenotóxico del Piquiá (*Caryocar villosum*) mediante el SCGE, utilizando como testigo positivo a la doxorubicina (DXR), en el que observo un efecto antimutagénico del consumo de la pulpa, en hígado, riñón, medula y células cardiacas, atribuido a sus compuestos fitoquímicos, algunos carotenoides, como la anteraxantina, zeaxantina, compuestos fenólicos como el ácido gálico y el ácido elágico, ramnosido, y  $\alpha$ -tocoferol. [144]

El posible mecanismo de quimioprotección de la DJD puede estar relacionado con su capacidad antioxidante debido a la presencia de sus metabolitos secundarios, como alcaloides, los diterpenos y los flavonoides[131], reconocidos por su capacidad antioxidante[151], la cual fue demostrada en el extracto acuoso y la decocción mediante el ensayo de intercepción de radicales libres con DPPH, lo que puede proteger al DNA de la oxidación provocada por los radicales hidroxilo y superóxido inducidos por la DAUNO [152]. La capacidad antioxidante de los metabolitos presentes en DJD podría ser la manera de actuar sobre su efecto genotóxico del antracíclico, ya que la decocción puede bloquear estas reacciones, impidiendo el ataque de los radicales libres sobre el material genético.

### 8.3 Efecto quimioprotector ante el daño genotóxico con MMS

El MMS ha sido utilizado en diversos estudios genotóxicos, debido a su capacidad de alquilación monofuncional del DNA [146, 153-156]. Las concentraciones utilizadas son variadas dependiendo del estudio, el incremento de daño evaluado mediante el SCGE en estudios *in vitro*, se observa con dosis que van desde los 0.75mM a 1.5mM de MMS en fibroblastos humanos, con 1 hora de exposición, exhibiendo niveles del 90µM de acuerdo con el TM y TL. [157]

Siddique, *et al.*, 2005, en su validación de la versión alcalina modificada del SCGE para la evaluación de la genotoxicidad en *Drosophila melanogaster*, comprobaron que MMS es más potente que la CF, el etil metanosulfonato y la N-etil-N-nitrosourea en concentraciones de 0.5 y 1.0 mM en células intestinales [158]. Resultados similares a los obtenidos en mamíferos de acuerdo con Sasaki *et al.*, 2000 [154]. Nuestro estudio apoya estas observaciones, pues a pesar de ser un estudio *in vivo*, utilizando mamíferos, el daño inducido por el MMS fue de 6 a 10 veces mayor que en el grupo testigo negativo, en el que se observaron bajas migraciones del DNA, de modo que se puede corroborar estadísticamente el efecto de la DJD en los tres grupos de experimentación.

El efecto quimioprotector de la DJD se observó en el hígado después de las 3 horas de tratamiento con MMS y la DJD, con las tres dosis evaluadas, el cual se mantuvo a las 21 horas con la DDA, es probable que se deba a su capacidad para metabolizar fármacos. De acuerdo con Hyun-Jung, *et al.*, 2000, hay dos posibles mecanismos implicados en la protección de células hepáticas (HTC y Hep G2) contra el daño provocado por benzo [a] pireno, uno de ellos es la activación de enzimas microsomales de biotransformación del sistema del CYP450 (Fase 1) que conduce a la reducción de la formación de metabolitos reactivos y aductos del DNA; y el otro mecanismo, consiste en la interacción directa con las sustancias químicas de la DJD.[159] La actividad antioxidante de los compuestos fenólicos

presentes en Bd-EAE puede contribuir a reducir el daño inducido por alquilación MMS.[170]

En riñón el efecto solo se observó en valores del TM a las 3 horas después del tratamiento con las tres dosis de la DJD, a las 9 horas con la DDA y DDM, a las 15 horas se observa una reducción significativa del daño del DNA con valores cercanos al testigo negativo sin diferencias estadísticamente significativas entre los grupos, probablemente debido a la reparación celular, después de la metabolización y eliminación de los compuestos, pues se ha reportado que el 50% de la alquilación del DNA inducido por el MMS en linfoblastos humanos se repara alrededor de los 15 minutos de incubación y hasta después de los 60 minutos, haciendo referencia al tiempo medio de eliminación de sitios sensibles a 3-metil adenina DNA glucósidas (AlkD)[155]. No está claramente determinado si el elevado nivel de reparación del DNA es inducido por la elevada exposición a agentes dañinos [160] o si se debe a la frecuencia de reparación intrínseca del individuo, es decir una alta tasa de reparación que limita las consecuencias potenciales del daño al DNA y reduce el riesgo de Cáncer.[155]

Considerando la presencia de diterpenos en la decocción de la *J. dioica*, podemos suponer que tienen un efecto quimioprotector similar el del palmitato de cafestol (C) y el kahweol (K), diterpenos del café, que han demostrado su actividad quimioprotectora mediante la inhibición de la sulfotransferasa, la inducción de la UDP-glucoroniltransferasa, actividades del CYP4501A1 y N-acetiltransferasa, que desintoxican los metabolitos reactivos en el DNA de 2-amino-1-metil-6-fenilimidazol [4,5-b] piridina (PhIP). Cuando se combina el C + K se observaron fuertes efectos protectores, reduciendo el 50% de la genotoxicidad inducida por la N-nitrosodimetilamina (NDMA) mediante la prueba de micronúcleos; Majer *et al.*, 2005, proponen que este efecto quimioprotector se deba a la inducción de enzimas de reparación del DNA.[161]

A pesar que durante las primeras 9 horas la DJD disminuyo la alquilación del DNA en hígado, riñón y médula ósea, probablemente a la presencia de compuestos fenólicos que pudieron actuar como sitios blanco para la alquilación impidiendo el ataque al DNA, como se observó en otro estudio en donde se redujo el daño inducido por el MMS al pre-tratar a los animales con jugo de naranja [137], donde el efecto no se mantuvo activo durante el resto del tiempo, resultando menos efectivo que lo observado con la CF.

Los terpenos presentes en la DJD pueden actuar de manera similar a lo observado por Hernández C. *et al.*,2002, quienes observaron una reducción significativa del daño provocado por MMS, haciendo referencia a los fitoquímicos presentes en el aceite de manzanilla, en su mayoría terpenos, como los posibles responsables del efecto antimutagénico, al proporcionar fuertes centros nucleofílicos, que le permiten reacciona con carcinógenos electrofílicos, como el MMS, este proceso podría interceptar el mutágeno y en consecuencia reducir la metilación del DNA.[150]

En células del riñón después de las 21 horas del tratamiento con la DJD se observó un incremento en el daño al DNA de tal modo que la DJD presenta un ligero efecto quimioprotector en las células del riñón, con daño inducido por alquilación directa del MMS, después de las 15 horas del tratamiento, se observa un incremento de las rupturas del DNA probablemente por procesos de reparación celular con la DDM, o bien a procesos apoptóticos. Este efecto puede deberse a la inducción del daño del DNA por un efecto prooxidante de esta dosis de la DJD, probablemente debida a su contenido en flavonoides.

De acuerdo a las investigaciones realizadas por Marcarini *et. al*, 2011, en su estudio sobre la toxicidad del flavonoide, rutina y sus efectos protectores, encontró que la mayor concentración de rutina (810µM) mostro efecto citotóxico en células hepáticas, después de 72 horas de tratamiento, reducción significativa de supervivencia celular y disminución de la proliferación celular, por lo que determinaron que una alta concentración y un mayor

tiempo de exposición la rutina es citotóxica, esta misma concentración evaluada mediante SCGE mostro efecto genotóxico después de 24 horas de tratamiento, exhibiendo > del 50% de nucleoides grado 2, de tal modo que proponen que el efecto citotóxico podría deberse la inducción de daño del DNA por un efecto prooxidante de esta concentración. [162] Los flavonoides pueden actuar como prooxidantes en lugar de actuar como antioxidantes, lo que provoca una muerte celular programada, de manera similar a lo encontrado con la quercetina y rutina, flavonoides, que han mostrado inducir apoptosis en células de hepatoma humano (HepG2), después de tratamientos prolongados a elevadas concentraciones (>100µM). [163]

De acuerdo con Woo *et al.*, 2005, flavonoides como quercetina y genisteina pueden inhibir la proliferación celular por modulación de la actividad de las quinasas dependientes de ciclinas (CDK), claves moleculares para la regulación del ciclo celular. Los flavonoides inhiben el crecimiento de células tumorales al impedir la progresión de las células a través de la transición de la fase G0, a la G1 del ciclo celular, que posteriormente conducen a la apoptosis, este bloqueo del ciclo está dado por inducción de factores nucleares y regulación a la baja de ciclinas D1 y E, que pueden estar asociados con la inhibición de CDK2, CDK4 y CDK5 y a la expresión de inhibidores de CDK como p21 y p27.[164]

En las primeras 3 y 9 horas el efecto quimioprotector es evidente con la DDA y la DDM; es posible que los compuestos fitoquímicos de la DJD, específicamente los flavonoides estén actuando como prooxidantes e induzcan a la célula a apoptosis; de tal modo que los incrementos en valores de daño del DNA se deban a células apoptóticas. Sin embargo de acuerdo a la publicación de Collins *et al.*, 2008 es poco probable que el SCGE detecte fragmentos de DNA que se producen en la apoptosis. Algunas investigaciones proponían que los cometas con casi todo el DNA en la cola y una cabeza pequeña, llamados cometas “erizo” catalogados en el Grado de daño 4, en la escala visual del ID, representaban a células apoptóticas y por lo tanto, algunos autores las excluyen de su puntuación, sin embargo tales cometas se ven regularmente después de tratamientos de la célula con una

dosis no letal, de agente perjudicial como  $H_2O_2$ , pero se ha comprobado que si las células se incuban por 30 minutos y se vuelven a preparar los cometas, estos ya no se observan, debido a que la célula ha reparado estos cortes, es decir no se está observando apoptosis, ya que esta no es una consecuencia inmediata y toma tiempo para desarrollarse, de modo que las rupturas son irreversibles. Entonces el incremento en las rupturas del DNA observado en el SCGE puede representar, procesos de reparación, o bien las primeras etapas de la apoptosis, pero los cometas “erizo” no pueden utilizarse como indicador específico de apoptosis.[165]

Morley *et al.*, 2006, describió un enfoque experimental interesante y revelador: después de incrustación de células en agarosa, pero antes de la lisis, las células apoptóticas se identificaron utilizando un método de Anexina-V fluorescencia tinción, basado en la unión de Anexina-V de la fosfatidil serina que se transloca a la membrana celular externa en una etapa temprana de la apoptosis. La combinación de tres métodos de tinción de color con el ensayo de cometa mostró que no había interferencia significativa de la reparación del DNA por procesos de fragmentación apoptóticas ya que la reparación del DNA se completó casi antes de la aparición de la fragmentación apoptótica. De tal modo que el SCGE apo / necro, reduce el problema general de los resultados falsos positivos en las pruebas de genotoxicidad con el SCGE. [166]

En las células de médula ósea solo se observó un descenso del daño al DNA con las DDB a las 3 horas de acuerdo al TM y al TL. El MMS mostro daño genotóxico desde las 3 horas hasta las 15 horas posteriores al tratamiento, el grupo de experimentación al que se le administro MMS y la DDB mostro incremento en las rupturas de la cadena del DNA a partir de 15 horas y hasta las 21 horas después del tratamiento. Lo cual sugiere que este incremento en las rupturas del DNA que puedan deberse a procesos de reparación celular o procesos de apoptosis.

Pereira, 2008, en su SCGE en células V79 encontró que plipartine, amida alcaloide, al que se le identificó la presencia de  $\alpha$   $\beta$  radical carbonilo insaturado del anillo de amida, requerimiento estructural importante para la actividad citotóxica, a concentraciones  $\geq$  de 2.5  $\mu\text{g/ml}$ , induce el rompimiento de la doble cadena de DNA, los valores obtenidos para el índice de daño son 92.75, 134 y 181 con concentraciones de 2.5  $\mu\text{g/ml}$ , 5  $\mu\text{g/ml}$  y 10  $\mu\text{g/ml}$ , respectivamente, debido a que los alcaloides son capaces de interactuar con el DNA y otros componentes celulares dando lugar a un amplio espectro de lesiones del DNA, incluyendo el letal, mediante el rompimiento de la cadena de DNA, lo provoca aberraciones cromosómicas, cabe señalar que como control positivo utiliza MMS a dosis de 40  $\mu\text{g/ml}$ . El tratamiento con plipartine incrementa la pérdida de potencial de membrana mitocondrial de manera dependiente de la dosis, de tal modo que esta alcaloide induce apoptosis en células V79.[167]

Vasconcelos, *et al.*, 2010 confirmó que biflorin, una orto-naftoquinona de *Capraria biflora* L. inhibe el crecimiento *in vivo* e *in vitro* de células tumorales, además de presentar una potente actividad antioxidante, sin embargo sus efectos son dependientes de la concentración, pues en concentraciones bajas tienen actividad significativa como antioxidante contra citotoxicidad, genotoxicidad, mutagenicidad y peroxidación lipídica que puede ser atribuido propiedad eliminadora del radical hidroxilo. Y a elevada concentración muestran tener efectos citotóxicos y genotóxicos en células V79 de mamífero. [168] Al ser evaluada esta capacidad en células de melanoma de ratón B16, se encontró que inducen apoptosis, mediante la reducción de la viabilidad celular, sin incrementar en células viables, inhibe la síntesis de DNA, induce fragmentación de DNA, despolariza mitocondrias sin atacar la integridad de la membrana, a dosis de 25mg/día/10días inhibiendo el crecimiento tumoral e incrementando la tasa de supervivencia media de 33.3 a 44.4. [169]

## IX CONCLUSIONES

La DJD actuó como inhibidor del efecto genotóxico inducido por la CF a partir de las 3 horas en células del hígado, con la tres dosis, efecto que se mantuvo hasta las 21 horas en dicho órgano. En células de riñón de ratones a los que se les indujo daño genotóxico con CF, no se observó ningún efecto quimioprotector de la DJD, sino por el contrario en consumo de la decocción, mostro un incremento de las rupturas del DNA en este órgano a las 21 horas de su administración. En células de médula ósea se observó un efecto quimioprotector de la DDA y DDM a las 3 horas y a las 9 horas el efecto se observó con las tres dosis de la DJD, a las 15 y 21 horas no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos. Por lo que se puede concluir que la DJD actúa como desmutágeno de la CF en células de hígado y médula a las 3 y 9 horas posterior a su administración, interviniendo probablemente en la activación metabólica de la CF, en el riñón por ser el órgano encargado de la depuración de sustancias tóxicas, pudo haber estado expuesto a metabolitos secundarios altamente genotóxicos por lo que la DJD no tienen efecto quimioprotector sobre este órgano, ante el daño provocado por la CF.

En células de hígado, de ratones tratados con DAUNO, se observó un efecto quimioprotector con la DDA a partir de las 3 horas de su administración, a las 9 horas se observó un incremento de lesiones con la DDM que disminuye a las 15 horas mostrando efecto quimioprotector junto con la DDA, en este mismo horario de observo un incremento de rupturas al DNA con la DDB, lesiones que disminuyen a las 21 horas en las que fue evidente el efecto quimioprotector de la DDA. En las células del riñón la DJD mostro su capacidad para inhibir el daño provocado por la DAUNO a las 3 horas de su administración efecto observado con la DDA, a las 9 horas con la tres dosis de la decocción y a las 12 horas con la DDA y DDM. En células de médula ósea, la DJD mostro una gran capacidad quimioprotectora al inhibir el daño provocado por la DAUNO en todos los horarios evaluados con las tres dosis de la DJD, lo cual nos indica acerca de su probable capacidad antioxidante.

En relación al efecto observado en ratones a los que se les indujo daño al DNA por alquilación directa con MMS, se encontró que la DJD mostro capacidad para inhibir la alquilación directa al DNA en células del hígado con la tres dosis de la DJD a las 3 horas de su administración y a las 21 horas con la DDA. En células de riñón, el efecto solo se observó a las 3 horas con las tres dosis de la DJD y a las 9 horas con la DDA y la DDM. En células de médula ósea, solo se observó efecto quimioprotector con la DDB a las 3 horas de su administración.

Se encontró que la DJD actúa como inhibidor del efecto genotóxico inducido por CF, DAUNO y MMS en células del hígado, efecto observado con la DDA, sin tener un claro efecto dosis dependiente, es posible que los componentes químicos de la DJD actúen como agentes antimutágenicos, o bien puede deberse al origen de la célula, ya que el hígado, permite mayor exposición de xenobioticos antes de mostrar efecto citotóxico o genotóxico por su capacidad para metabolizar fármacos.

El mayor efecto quimioprotector se observó en los ratones tratados con DAUNO, en los tres órganos evaluados, hígado, riñón y médula ósea, en mayor proporción con la DDA, es posible que los fitoquímicos presentes en la DJD actúen como inhibidores del estrés oxidativo, es decir que tengan potente actividad antioxidante dependiente de la dosis.

Se encontró que la DJD incremento de manera significativa las rupturas del DNA en células del riñón y médula ósea 21 horas después de su administración, puede deberse, en el caso del riñón a metabolitos genotóxicos eliminados por la orina, o bien a procesos de reparación celular o procesos apoptóticos, desafortunadamente el SCGE tiene sus limitaciones al respecto, por lo que se requieren de más estudios para determinar si las lesiones se deben a procesos de reparación o bien a apoptosis.

La DJD mostró un ligero efecto como inhibidor de la alquilación directa inducida por MMS en células de hígado, riñón y médula a las 3 y 9 horas posterior al tratamiento, sin embargo los niveles de daño se mantuvieron en niveles elevados mostrando diferencias estadísticamente significativas contra el testigo negativo, en los tres órganos evaluados en los cuatro horarios, es por ello que la DJD mostro menor efecto contra la alquilación directa provocada por el MMS.

## X RECOMENDACIONES

Como se puede observar en nuestro estudio, existen indicios de que la decocción de la *J. dioica*, puede tener efecto quimioprotector del DNA, inhibiendo lesiones que pueden desencadenar enfermedades crónicas como la Diabetes Mellitus, Enfermedades crónico vascular y cáncer.

Es recomendable continuar con las investigaciones para indagar acerca de su potencial antioxidante.

Es importante y la purificación y determinación de las sustancias presentes, ya que las diversas moléculas podrían interactuar y generar los altos niveles de genotoxicidad u otro tipo de interferencia.

Para complementar el estudio vale la pena determinar si las rupturas al DNA observados en nuestro ensayo se deben a rupturas por reparación o a procesos apoptóticos, por lo que es recomendable continuar con estudios relacionados con procesos de reparación.

Descartar su efecto genotóxico para el riñón, o bien la presencia de metabolitos secundarios con mayor capacidad genotóxica que la propia decocción a través de la prueba de Ames.

Se recomienda realizar más pruebas a partir de la dosis máxima o bien a partir de extractos. Probando otras dosis mayores a las indicadas, para determinar el efecto quimioprotector de los compuestos de la *J. dioica*.

Se recomienda la continuidad del trabajo, a través de otros modelos biológicos para ampliar la información acerca de su capacidad antimutágena. Mediante la valoración correspondiente.

## XI BIBLIOGRAFÍA

1. Vandghanooni, S. and M. Eskandani, *Comet Assay : A Method to Evaluate Genotoxicity of Nano-Drug Delivery*. Sciences-New York, 2011. **1**(2): p. 87-97.
2. Anderson, D., *et al.*, *The effect of various antioxidants and other modifying agents on oxygen-radical-generated DNA damage in human lymphocytes in the COMET assay*. *Mutat Res*, 1994. **307**(1): p. 261-71.
3. Granada, U.d.; Available from: <http://www.ugr.es/~quiores/pnatu/fig/rutamevalo.gif>.
4. Maps, G. 2012; Available from: <http://maps.google.es/?hl=es>.
5. Katzung, B.G., *Farmacología básica y clínica*. 1996: El Manual Moderno.
6. Taiz, L. and E. Zeiger, *Fisiología Vegetal*. 2006: Universitat Jaume I.
7. DePamphilis, M.L., *DNA Replication and Human Disease*. 2006: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
8. De Flora, S., *Mechanisms of inhibitors of mutagenesis and carcinogenesis*. *Mutat Res*, 1998. **402**(1-2): p. 151-8.
9. Yang, J., Y.O. Long, and L.A. Paquette, *Concise total syntheses of the bioactive mesotricyclic diterpenoids jatrophatrione and citlaltione*. *J Am Chem Soc*, 2003. **125**(6): p. 1567-74.
10. Andreassi, M.G., *et al.*, *Genetic instability and atherosclerosis: can somatic mutations account for the development of cardiovascular diseases?* *Environ Mol Mutagen*, 2000. **35**(4): p. 265-9.
11. Fiala, E.S., *Investigations into the metabolism and mode of action of the colon carcinogens 1,2-dimethylhydrazine and azoxymethane*. *Cancer*, 1977. **40**(5 Suppl): p. 2436-45.
12. De Flora, S., *et al.*, *Multiple points of intervention in the prevention of cancer and other mutation-related diseases*. *Mutat Res*, 2001. **480-481**: p. 9-22.
13. Deguchi, T., R. Ohba, and S. Ueda, *Radical scavenging activity of a purple pigment, hordeumin, from uncooked barley bran-fermented broth*. *J Agric Food Chem*, 2000. **48**(8): p. 3198-201.
14. *Jerarquía Taxonómica del Género Jatropha*, I.N.d. Biodiversidad, Editor. 1997.
15. Argueta, A. and C. Zolla, *Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana*, UNAM, Editor. 2009, Instituto Nacional Indigenista: México.
16. Can-Aké, R., *et al.*, *Bioactive Terpenoids from Roots and Leaves of Jatropha gaudieri*. *Rev. Soc. Quím. Méx*, 2004. **48**(1): p. 11-14.
17. Thomas, R., N.K. Sah, and P.B. Sharma, *Therapeutic biology of Jatropha curcas: a mini review*. *Curr Pharm Biotechnol*, 2008. **9**(4): p. 315-24.
18. Naengchomng W, T.Y., Wiriyachitra P, Okamoto KT, Clardy J, *Isolation and structure determination of four novel diterpenes from Jatropha curcas*. *Tetrahedron Lett*, (1986) **27**: p. 2439–2442.
19. Evans FJ, T.S., *Proinflammatory, tumour-promoting and anti-tumour diterpenes of the plant families Euphorbiaceae and Thymelaeaceae*. *Prog Chem Org Nat Prod* 1983 **44**: p. 1–99.
20. ADOLF, W.O., H.J. & HECKER, E., *Irritant phorbol derivatives from four Jatropha species*. *Phytochemistry*, 1984. **23**(1): p. 129-132.

21. Barba Avila de los Dolores , M., M.C.H. Duque, and M. de la Cerda Lemus, *Plantas útiles de la Región Semiárida de Aguascalientes*. 2003: Universidad Autónoma de Aguascalientes.
22. Martínez, M. and E. Matuda, *Flora del Estado de México*. 1979: Biblioteca Enciclopédica del Estado de México.
23. Filardo Kerstupp, S., Zúñiga Estrada, A., & Cruz Martínez, B. R., *El éxito de la Universidad Autónoma Del Estado De Hidalgo en la vinculación y transferencia de tecnología en la elaboración de productos de tocador (champús y cremas) y alimentos (mermeladas) a grupos indígenas*, in *Centro de Investigaciones Químicas*, U.A.d.E.d.H. (UAEH), Editor. 2006 Pachuca de Soto, Hgo.
24. Manzanero Medina, G.I., *et al.*, ., ., ., *Polibotánica*, Instituto Politécnico Nacional., Escuela Nacional de Ciencias Biológicas (Mexico). Departamento de Botánica., and Escuela Nacional de Ciencias Biológicas (Mexico). Laboratorio de Botánica Fanerógamica., Editors. 1996, Laboratorio de Botánica Fanerógamica, Departamento de Botánica, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas: México. p. v.
25. Flores, J. and E. Jurado, *Are nurse-protégé interactions more common among plants from arid environments?* *Journal of Vegetation Science*, 2003. **14**(6): p. 911-916.
26. Sosa M, G.J., Lebgue T, Soto R, Puga S. , *Clasificación de las comunidades vegetales en la región árida del estado de Chihuahua, México*. . *Ecología Aplicada*, 2006. **5**: p. 53-59.
27. Rivera García, E., *An annotated checklist of some orthopteroid insects of Mapimi Biosphere Reserve (Chihuahuan desert), Mexico*. 2006, Instituto de Ecología A.C.
28. Granados-Sánchez D, S.-G.A., *Clasificación fisonómica de la vegetación de la Sierra de Catorce, San Luis Potosí, a lo largo de un gradiente altitudinal*. . *Terra Latinoamericana*, 2003. **21** p. 321-332. Disponible en: <http://redalyc.uaemex.mx/src/inicio/ArtPdfRed.jsp?iCve=57321303>. Consultado el 5 de julio de 2012. .
29. Martínez Ávalos, M.E., *Determinación del estado actual de cinco especies de cactáceas amenazadas del estado de Tamaulipas, México*. , U.A.d. Tamaulipas, Editor. 1999 Instituto de Ecología y Alimentos Informe final SNIB-CONABIO proyecto No. H149. : México D. F. .
30. Pérez Escandón, B.E., M.Á. Villavicencio Nieto, and A. Ramírez Aguirre, *Lista de las plantas útiles del Estado de Hidalgo*. 2003: Uaeh.
31. Federación, D.O.d.l. *Plan de Desarrollo Estatal*. [cited 8 de Agosto de 2010; Available from: [http://copladet.tamaulipas.gob.mx/planes\\_mpales\\_08/bustamante.pdf](http://copladet.tamaulipas.gob.mx/planes_mpales_08/bustamante.pdf).
32. INEGI. *Carta de Uso del Suelo y Vegetación, 1:1 000 000*. 2011; Available from: [www.inegi.org.mx](http://www.inegi.org.mx).
33. Martinez, M., *Las plantas medicinales de Mexico*. 2004: Librería y Ediciones Botas.
34. Domínguez Oropeza, I., *Estudio etnobotánico de plantas medicinales de Tunititlan, Hgo. y evaluación antibacteriana de la especie vegetal más empleada en el tratamiento de enfermedades de etiología infecciosa*, in *Licenciatura En Biología Experimental*, Universidad Autonoma Metropolitana. p. 46-47.
35. Yang, J., Y.O. Long, and L.A. Paquette, *Concise Total Syntheses of the Bioactive Mesotricyclic Diterpenoids Jatrophatrione and Citlalitrione*. *Journal of the American Chemical Society*, 2003. **125**(6): p. 1567-1574.

36. Pertino, M., *et al.*, *Gastroprotective activity and cytotoxic effect of cyperenoic acid derivatives*. J Pharm Pharmacol, 2006. **58**(11): p. 1507-13.
37. Villarreal, A.M., *et al.*, *Citlaltitrone, a new diterpene from Jatropha dioica var. sessiliflora*. J Nat Prod, 1988. **51**(4): p. 749-53.
38. Baskar, A.A., *et al.*, *Chemopreventive potential of beta-Sitosterol in experimental colon cancer model--an in vitro and In vivo study*. BMC Complement Altern Med, 2010. **10**: p. 24.
39. García Hernández, D.G., *et al.*, *Evaluación antimicrobiana de los extractos metanólico de Ficus carica y hexánico de Jatropha dioica sobre Staphylococcus aureus, Bacillus cereus, Bacillus subtilis y Candida albicans.*, in *ACADEMIA QUÍMICO BIOLÓGICAS, PROVERICYT*. 2006, UANL: SAN NICOLÁS DE LOS GARZA, NL.
40. Argueta, A., M.C.G. Vázquez, and I.N. Indigenista, *Atlas de las plantas de la medicina tradicional mexicana*. 2009: Instituto Nacional Indigenista.
41. *COMET ASSAY INTEREST GROUP*. 2011; Available from: <http://cometassay.com/index.htm>.
42. Recio, L., *et al.*, *Dose-response assessment of four genotoxic chemicals in a combined mouse and rat micronucleus (MN) and Comet assay protocol*. J Toxicol Sci, 2010. **35**(2): p. 149-62.
43. *OMS - Medicina Tradicional*. 2008 [cited 2010; Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs134/es/index.html>.
44. Jagetia G, K.S., Aggarwal BB. , *Chapter 14 Natural Agents That Can Sensitize Tumor Cells to Chemotherapy and Radiation Therapy*. .
45. Newman, D.J., G.M. Cragg, and K.M. Snader, *Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002*. J Nat Prod, 2003. **66**(7): p. 1022-37.
46. Bannerman, R.H.O., *et al.*, *Traditional medicine and health care coverage : a reader for health administrators and practitioners*. 1983, Geneva: World Health Organization ; Albany, N.Y. : WHO Publications Centre USA, distributor. 342 p., 16 p. of plates.
47. Dixon, R.A., *Natural products and plant disease resistance*. Nature, 2001. **411**(6839): p. 843-7.
48. Pabon, A., *et al.*, *Evaluation of the mutagenicity of antimalarial products isolated from Solanum nudum (Solanaceae)*. Pharmazie, 2003. **58**(4): p. 263-7.
49. Morón Rodríguez, F., *Las plantas medicinales, la medicina y los sistemas de salud*. Revista Cubana de Plantas Medicinales, 2012. **17**: p. 210-212.
50. Cupp, M.J., *Herbal remedies: adverse effects and drug interactions*. Am Fam Physician, 1999. **59**(5): p. 1239-45.
51. Anonymus, *Americans consume more dietary supplements than ever before*. Bio|Analogics, 2002. **2**.
52. Guerrero García Jeronimo, F.J., Tellez Haro Araceli, Trejo Perea Dennia, Ortiz Murillo Mario, Badillo Pineda Alfredo, Flores Ojeda Sofia Gabriela, *Vigencia de los derechos indigenas de México C.N.p.e.D.d.I.P. Indígenas, et al., ., ., ., Editors*. 2007: Mexico, D. F.
53. F. Castillo, D.H.n., G. Gallegos, R. Rodríguez and C. N. Aguilar, *Antifungal Properties of Bioactive Compounds from Plants*, in *Fungicides for Plant and Animal Diseases*. 2012.

54. Liu, C., R.M. Russell, and X.D. Wang, *Alpha-tocopherol and ascorbic acid decrease the production of beta-apo-carotenals and increase the formation of retinoids from beta-carotene in the lung tissues of cigarette smoke-exposed ferrets in vitro*. J Nutr, 2004. **134**(2): p. 426-30.
55. Almudena, G.P., *Efecto protector de los isotiocianatos y organosulfurados solos o en combinación con la vitamina C frente al daño al dna inducido por la n-nitrosopiperidina y la n-nitrosobutilamina: mecanismos de acción.*, in *Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos*. 2011, UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID: Madrid.
56. Ferrer, M., *et al.*, *Antimutagenic mechanisms of Phyllanthus orbicularis when hydrogen peroxide is tested using Salmonella assay*. Mutat Res, 2002. **517**(1-2): p. 251-4.
57. Hernández Lauzardo, A.N., S. Bautista Baños, and M.G. Velázquez del Valle, *PROSPECTIVE OF PLANT EXTRACTS FOR CONTROLLING POSTHARVEST DISEASES OF HORTICULTURAL PRODUCTS*. Rev. Fitotec. Mex., 2007. **30** ((2)): p. 119 - 123,.
58. TABARES, C.X.B., *Evolución farmacológica de terpenos y flavonoides de origen vegetal*, in *CIENCIAS Y TECNOLOGÍAS/28*. 2007, Universidad de la Laguna.
59. Collins, A.R., *Carotenoids and genomic stability*. Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, 2001. **475**(1-2): p. 21-28.
60. Bruneton, J., *et al.*, *Farmacognosia: Fitoquímica, Plantas Medicinales*. 2001: Acribia, Editorial, S.A.
61. Serrano, M.E.D., M.L. López, and T.d.R.S. Espuñes, *COMPONENTES BIOACTIVOS DE ALIMENTOS FUNCIONALES DE ORIGEN VEGETAL* Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas 2006. **37**(004): p. 58-68.
62. Durán, R.M. and R.B. Padilla, *Actividad antioxidante de los compuestos fenólicos* B 1993. 1993.
63. ROJANO, B.A., *et al.*, *Actividad antioxidante del isoespintanol en diferentes medios*. Vitae, 2008. **15**: p. 173-181.
64. Avello, M. and M. Suwalsky, *Radicales libres, antioxidantes naturales y mecanismos de protección*. Atenea (Concepción), 2006: p. 161-172.
65. Duthie, S.J., *Berry phytochemicals, genomic stability and cancer: evidence for chemoprotection at several stages in the carcinogenic process*. Mol Nutr Food Res, 2007. **51**(6): p. 665-74.
66. Serce, S., *et al.*, *Antioxidant activities and fatty acid composition of wild grown myrtle (Myrtus communis L.) fruits*. Pharmacogn Mag, 2010. **6**(21): p. 9-12.
67. Zamorano-Ponce, E., *et al.*, *Anti-genotoxic effect of Aloysia triphylla infusion against acrylamide-induced DNA damage as shown by the comet assay technique*. Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, 2006. **603**(2): p. 145-150.
68. Kwon, D., *et al.*, *Antioxidant and antigenotoxic activities of Angelica keiskei, Oenanthe javanica and Brassica oleracea in the Salmonella mutagenicity assay and in HCT116 human colon cancer cells*. Biofactors, 2006. **26**(4): p. 231-44.
69. Arencibia Arrebola, D.F., *et al.*, *Las plantas, fuente de agentes antimutagénicos y quimiopreventivos*. Revista de Toxicología en línea, 2009. **21**: p. 37-51.

70. Steinmann, V.W. *Diversidad y endemismo de la familia Euphorbiaceae en México*. Acta Botánica Mexicana 2002 [cited 61; 61 - 93]. Available from: <http://redalyc.uaemex.mx/redalyc/src/inicio/ArtPdfRed.jsp?iCve=57406107>.
71. Martínez Gordillo Martha, J.R.J., Cruz Durán Ramiro, Juárez Arriaga Edgar, García Roberto, Cervantes Angélica y Mejía Hernández Ricardo (2002) *LOS GÉNEROS DE LA FAMILIA EUPHORBIACEAE EN MÉXICO (PARTE D)*. Anales del Instituto de Biología. Serie Botánica **73**, 245-281.
72. Instituto Politécnico Nacional., Escuela Nacional de Ciencias Biológicas (Mexico). Departamento de Botánica., and Escuela Nacional de Ciencias Biológicas (Mexico). Laboratorio de Botánica Fanerógamica., *Polibotánica*. 1996, Laboratorio de Botánica Fanerógamica, Departamento de Botánica, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas: México. p. v.
73. SAGARPA. *Producción de biodiesel a partir de Jatropha*. 2011; Available from: <http://www.bioenergeticos.gob.mx/index.php/biodiesel.html>.
74. Martínez Herrera J., M. (2008) "*El piñón mexicano: fuente de energía renovable en el estado de Morelos*". . Foro nacional sobre cultivos productores de biodiesel (*Jatropha curcas*, *Ricinus communis*). 13-23.
75. Sharma, S.K. and H. Singh, *A review on pharmacological significance of genus Jatropha (Euphorbiaceae)*. Chin J Integr Med, 2012. **18**(11): p. 868-880.
76. Mothana, R.A. and U. Lindequist, *Antimicrobial activity of some medicinal plants of the island Soqotra*. J Ethnopharmacol, 2005. **96**(1-2): p. 177-81.
77. Hamza, O.J., et al., *Antifungal activity of some Tanzanian plants used traditionally for the treatment of fungal infections*. J Ethnopharmacol, 2006. **108**(1): p. 124-32.
78. Akihisa, T., et al., *Triterpene alcohols from the flowers of compositae and their anti-inflammatory effects*. Phytochemistry, 1996. **43**(6): p. 1255-60.
79. Perry, L.M. and J. Metzger, *Medicinal plants of East and Southeast Asia : attributed properties and uses*. 1980, Cambridge: MIT Press. 620 p.
80. Graham, J.G., et al., *Plants used against cancer - an extension of the work of Jonathan Hartwell*. J Ethnopharmacol, 2000. **73**(3): p. 347-77.
81. Heller, J., I.P.G.R. Institute, and G. Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung Gatersleben, *Physic Nut, Jatropha Curcas L*. 1996: International Plant Genetic Resources Institute.
82. R, I.C., C.R.C. R, and U.d. Valle, *Las Plantas y Sus Usos en Las Islas de Providencia y Santa Catalina*. 2005: Programa Editorial Universidad del Valle.
83. Agriculture, F.D.o., C.S.D.o.P. Industry, and K.R. Langdon, *Physic Nut, Jatropha Curcas*. 1977.
84. Canales, M., et al., *Informant consensus factor and antibacterial activity of the medicinal plants used by the people of San Rafael Coxcatlan, Puebla, Mexico*. J Ethnopharmacol, 2005. **97**(3): p. 429-39.
85. Cházaro, M., *Antología botánica del occidente de México*. 2002: Universidad de Guadalajara, Departamento de Geografía y Ordenación Territorial.
86. Villarreal R L, G.M.A., Hernández G A, B E Herrera-Cabrera, *La Biodiversidad en Puebla: Estudio de Estado*. , CONABIO, Editor. 2011, CONABIO: México.
87. Herbario IEB del Instituto de Ecología, A.C. *México (IE-BAJÍO) within the viewed area (142°W, 4°N, 62°W, 44°N)*. 2011; Available from: <http://data.gbif.org/datasets/resource/11106>.

88. Wong-Paz, J.E., *et al.*, (2010) *Jatropha dioica: Fuente potencial de agentes antimicrobianos*. **2**.
89. Theoduloz, C., *et al.*, . *Antiproliferative activity of the diterpenes jatrophone and jatropholone and their derivatives*. *Planta Med*, 2009. **75**(14): p. 1520-2.
90. dos Santos, A.F. and A.E. Sant'Ana, *Molluscicidal activity of the diterpenoids jatrophone and jatropholones A and B isolated from Jatropha elliptica (Pohl) Muell. Arg.* *Phytother Res*, 1999. **13**(8): p. 660-4.
91. Kupchan, S.M., *et al.*, *Structure and stereochemistry of jatrophone, a novel macrocyclic diterpenoid tumor inhibitor*. *J Am Chem Soc*, 1976. **98**(8): p. 2295-2300.
92. Lillehaug, J.R., *et al.*, *Reaction of biological thiols with the tumor inhibitor jatrophone. Inhibition of RNA polymerase*. *Biochim Biophys Acta*, 1973. **327**(1): p. 92-100.
93. Menezes, F.V., *et al.*, *Inhibition of insulin release by Jatrophone*. *Braz J Med Biol Res*, 1992. **25**(3): p. 305-7.
94. Silva, A.M., R.L. Brum, and J.B. Calixto, *The relaxant action of jatrophone in rat portal vein. A comparison with protein kinase C inhibitors*. *Life Sci*, 1995. **57**(9): p. 863-71.
95. Aguilera-Carbo, A., *et al.*, *Extraction and analysis of ellagic acid from novel complex sources*. *Chemical Papers*, 2008. **62**(4): p. 440-444.
96. Altieri, F., *et al.*, *DNA damage and repair: from molecular mechanisms to health implications*. *Antioxid Redox Signal*, 2008. **10**(5): p. 891-937.
97. Orozco M., M.d.C.F.R., Rodolfo; Loeza L., Pedro D. y Santoyo P., Gustavo. , *Cáncer: La importancia de reparar cortes en el ADN y perspectivas desde la farmacogenómica*. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 2010. **41**: p. 7-14.
98. Loeb, L.A., K.R. Loeb, and J.P. Anderson, *Multiple mutations and cancer*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003. **100**(3): p. 776-81.
99. Barrett, J.C., *Molecular and environmental causes of cancer*. *Drug Metab Rev*, 2000. **32**(2): p. 139-42.
100. Shimada, M. and M. Nakanishi, *DNA damage checkpoints and cancer*. *J Mol Histol*, 2006. **37**(5-7): p. 253-60.
101. Ravi, D., *et al.*, *A Network of Conserved Damage Survival Pathways Revealed by a Genomic RNAi Screen*. *PLoS Genet*, 2009. **5**(6): p. e1000527.
102. Kada, T., H. Mochizuki, and K. Miyao, *Antimutagenic effects of germanium oxide on Trp-P-2-induced frameshift mutations in Salmonella typhimurium TA98 and TA1538*. *Mutat Res*, 1984. **125**(2): p. 145-51.
103. Wattenberg, L.W., *Inhibition of carcinogen-induced neoplasia by sodium cyanate, tert-butyl isocyanate, and benzyl isothiocyanate administered subsequent to carcinogen exposure*. *Cancer Res*, 1981. **41**(8): p. 2991-4.
104. FREI, *et al.*, *Preclinical studies and clinical correlation of the effect of alkylating dose*. Vol. 48. 1988, Philadelphia, PA, ETATS-UNIS: American Association for Cancer Research.
105. Sierrasesíмага, L., *Tratado de oncología pediátrica*. 2006: Pearson Educación.
106. Vidrios, M.V.G., *Manual terapéutico de enfermedades onco-hematológicas*. 1999: Editorial Prado.

107. Selvakumar, E., *et al.*, *Chemoprotective effect of lipoic acid against cyclophosphamide-induced changes in the rat sperm*. *Toxicology*, 2006. **217**(1): p. 71-78.
108. Al-Yahya, A.A., *et al.*, *Acacia Senegal Gum Exudate Offers Protection Against Cyclophosphamide-Induced Urinary Bladder Cytotoxicity*. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2009. **2**(4): p. 207-213.
109. TE, *et al.*, ., ., ., *In vivo effects of chlorophyllin on the antitumour agent cyclophosphamide*. Vol. 70. 1997, Hoboken, NJ, ETATS-UNIS: Wiley-Blackwell.
110. Prieto, G., Errecalde, C., Trotti, N., *Farmacología clínica de los antineoplásicos*. *Monog Med Vet.*, 1999. **19**: p. 1-8.
111. Arencibia Arrebola, D.F., *et al.*, *Respuesta de ratas Sprague Dawley a la ciclofosfamida y bleomicina en el ensayo cometa alcalino de leucocitos de sangre periférica*. *Revista de Toxicología en línea*, 2010. **30**: p. 21-35.
112. Huang, R.S., *et al.*, *Genetic variants contributing to daunorubicin-induced cytotoxicity*. *Cancer Res*, 2008. **68**(9): p. 3161-8.
113. Drabløs, F., *et al.*, *Alkylation damage in DNA and RNA—repair mechanisms and medical significance*. *DNA Repair*, 2004. **3**(11): p. 1389-1407.
114. Santos-Mello, R., *et al.*, *Chemoprotective effect of cysteamine against the induction of micronuclei by methyl methanesulfonate and cyclophosphamide*. *Genetics and Molecular Biology*, 2005. **28**: p. 156-160.
115. Wahnschaffe, U., *et al.*, *Mutagenicity testing with transgenic mice. Part I: Comparison with the mouse bone marrow micronucleus test*. *J Carcinog*, 2005. **4**(1): p. 3.
116. Tice, R.R. and G.H. Strauss, *The single cell gel electrophoresis/comet assay: a potential tool for detecting radiation-induced DNA damage in humans*. *Stem Cells*, 1995. **13 Suppl 1**: p. 207-14.
117. Burlinson, B., *et al.*, *Fourth International Workgroup on Genotoxicity testing: results of the in vivo Comet assay workgroup*. *Mutat Res*, 2007. **627**(1): p. 31-5.
118. Raymond Tice, P.D. and B.S. Marie Vasquez, *PROTOCOL FOR THE APPLICATION OF THE pH>13 ALKALINE SINGLE CELL GEL (SCG) ASSAY TO THE DETECTION OF DNA DAMAGE IN MAMMALIAN CELLS*. Research Triangle Park, 1998: p. 1-8.
119. Tice, R.R., *et al.*, *Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing*. *Environ Mol Mutagen*, 2000. **35**(3): p. 206-21.
120. Fairbairn, D.W., P.L. Olive, and K.L. O'Neill, *The comet assay: a comprehensive review*. *Mutat Res*, 1995. **339**(1): p. 37-59.
121. Hartmann, A., *et al.*, *Recommendations for conducting the in vivo alkaline Comet assay. 4th International Comet Assay Workshop*. *Mutagenesis*, 2003. **18**(1): p. 45-51.
122. Collins, A.R., *The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations*. *Mol Biotechnol*, 2004. **26**(3): p. 249-61.
123. Lee, R.F. and S. Steinert, *Use of the single cell gel electrophoresis/comet assay for detecting DNA damage in aquatic (marine and freshwater) animals*. *Mutat Res*, 2003. **544**(1): p. 43-64.
124. Nadin, S.B., L.M. Vargas-Roig, and D.R. Ciocca, *A silver staining method for single-cell gel assay*. *J Histochem Cytochem*, 2001. **49**(9): p. 1183-6.

125. Duez, P., *et al.*, *Statistics of the Comet assay: a key to discriminate between genotoxic effects*. *Mutagenesis*, 2003. **18**(2): p. 159-66.
126. Gichner, T., A. Mukherjee, and J. Veleminsky, *DNA staining with the fluorochromes EtBr, DAPI and YOYO-1 in the comet assay with tobacco plants after treatment with ethyl methanesulphonate, hyperthermia and DNase-I*. *Mutat Res*, 2006. **605**(1-2): p. 17-21.
127. Cavas, T. and S. Konen, *Detection of cytogenetic and DNA damage in peripheral erythrocytes of goldfish (Carassius auratus) exposed to a glyphosate formulation using the micronucleus test and the comet assay*. *Mutagenesis*, 2007. **22**(4): p. 263-8.
128. Ferlay J, S.H., Bray F, Forman D, Mathers C and Parkin DM. (2010) *Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase GLOBOCAN 2008 v1.2, No. 10*.
129. Geografía, I.N.d.E.y., *Mujeres y hombres en México 2010*, I.N.d.E.y. Geografía, Editor. 2010: Aguascalientes, Ags.
130. Niz Lora, D., *Contribución al conocimiento de las plantas medicinales de la sierra de Manantlán, Jalisco.*, in *Facultad de Ciencias*. 1989, Universidad de Guadalajara.: Guadalajara, Jal.
131. Tenorio Morales, P.L., *Contribución al conocimiento toxicológico de la decocción elaborada con la raíz de Jatropha dioica sessé ex cerv. Mediante la prueba de micronúcleos y un tamizaje fitoquímico* in *Instituto de Ciencias Básicas e Ingeniería Licenciatura en Biología*. 2012, UAEH: Pachuca de Soto, Hgo.
132. Miller, P.E. and D.C. Snyder, *Phytochemicals and cancer risk: a review of the epidemiological evidence*. *Nutr Clin Pract*, 2012. **27**(5): p. 599-612.
133. Sak, K., *Chemotherapy and Dietary Phytochemical Agents*. *Chemotherapy Research and Practice*, 2012. **2012**: p. 11.
134. Watson, W.H., V. Zabel, and X.A. Dominguez, *Riolozatrione*. *Acta Crystallographica Section B*, 1982. **38**(2): p. 689-691.
135. Arencibia Arrebola, D.F. and L.A. Rosario Fernández, *Evaluación de ratas Sprague Dawley como biomodelo para detectar daño en el ADN de leucocitos de sangre periférica y células hepáticas, mediante el ensayo Comet*. *Ars pharmaceutica*, 2010. **51**(1): p. 49-56.
136. Arencibia Arrebola D, V.N.A., Rosario Fernández L, Suárez Fernández Y, Delgado Roche L. , *Respuesta de ratones Balb/c frente a ciclofosfamida y bleomicina en el ensayo cometa alcalino de linfocitos de sangre periférica*. . *Revista de Toxicología*, 2011. **28**: p. 152-157.
137. Franke, S.I., *et al.*, *Influence of orange juice over the genotoxicity induced by alkylating agents: an in vivo analysis*. *Mutagenesis*, 2005. **20**(4): p. 279-83.
138. Badías, L.C., *et al.*, *VIMANG: los efectos antígenotóxico y modulador de las enzimas glutatión peroxidasa y glutatión-S-transferasa*. *Rev Cubana Invest Biomed*, 2001. **20**(1): p. 48-53.
139. Laruta, M.S.C., *Estudios preliminares hacia la estandarización para la valoración hepatotóxica y nefrotóxica de extractos vegetales (persea americana) en ratones*, in *Facultad De Ciencias Farmacéuticas Y Bioquímicas Carrera De Bioquímica Instituto Seladis*. 2005, Universidad Mayor De San Andres: La Paz - Bolivia.

140. Jagetia, G.C., V.A. Venkatesha, and T.K. Reddy, *Naringin, a citrus flavonone, protects against radiation-induced chromosome damage in mouse bone marrow*. *Mutagenesis*, 2003. **18**(4): p. 337-43.
141. Hernández.-R.J, *et al.*, *Potencial quimioprotector de la Jatropha dioica sobre la capacidad genotóxica de daunorrubicina, metilmetanosulfonato y ciclofosfamida, así como el efecto antitumoral en el ratón cepa icr con leucemia murina L5178Y*. . 2011, UAEH: Pachuca de Soto, Hgo.
142. Ansari, K.M., *et al.*, *In vivo DNA damaging potential of sanguinarine alkaloid, isolated from argemone oil, using alkaline Comet assay in mice*. *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*, 2005. **43**(1): p. 147-153.
143. Jagetia, G., S.K. Krishnan, and B.B. Aggarwal, *Natural Agents That Can Sensitize Tumor Cells to Chemotherapy and Radiation Therapy*. *Sensitization of Cancer Cells for Chemo/Immuno/Radio-therapy*, 2008: p. 211-240.
144. Almeida, M.R., *et al.*, *Antigenotoxic effects of piquia (Caryocar villosum) in multiple rat organs*. *Plant Foods Hum Nutr*, 2012. **67**(2): p. 171-7.
145. Bachur, N.R., S.L. Gordon, and M.V. Gee, *Anthracycline antibiotic augmentation of microsomal electron transport and free radical formation*. *Mol Pharmacol*, 1977. **13**(5): p. 901-10.
146. Saffi, J., *et al.*, *Effect of the anti-neoplastic drug doxorubicin on XPD-mutated DNA repair-deficient human cells*. *DNA Repair (Amst)*, 2010. **9**(1): p. 40-7.
147. Keizer, H.A. and A.D. Rogol, *Physical exercise and menstrual cycle alterations. What are the mechanisms?* *Sports Med*, 1990. **10**(4): p. 218-35.
148. Gaylis, F.D., *et al.*, *Plasminogen activators in human prostate cancer cell lines and tumors: correlation with the aggressive phenotype*. *J Urol*, 1989. **142**(1): p. 193-8.
149. Munoz-Gamez, J.A., *et al.*, *PARP inhibition sensitizes p53-deficient breast cancer cells to doxorubicin-induced apoptosis*. *Biochem J*, 2005. **386**(Pt 1): p. 119-25.
150. Hernandez-Ceruelos, A., E. Madrigal-Bujaidar, and C. De La Cruz, *Inhibitory effect of chamomile essential oil on the sister chromatid exchanges induced by daunorubicin and methyl methanesulfonate in mouse bone marrow*. *Toxicology letters*, 2002. **135**(1): p. 103-110.
151. Devappa, R.K., H.P. Makkar, and K. Becker, *Nutritional, biochemical, and pharmaceutical potential of proteins and peptides from jatropha: review*. *J Agric Food Chem*, 2010. **58**(11): p. 6543-55.
152. Laurent, G. and J.P. Jaffrezou, *Signaling pathways activated by daunorubicin*. *Blood*, 2001. **98**(4): p. 913-24.
153. Stang, A., *et al.*, *Automated analysis of DNA damage in the high-throughput version of the comet assay*. *Mutat Res*, 2010. **698**(1-2): p. 1-5.
154. SASAKI, *et al.*, *The comet assay with multiple mouse organs : Comparison of Comet assay results and Carcinogenicity with 208 chemicals selected from the IARC monographs and U.S. NTP Carcinogenicity database*. Vol. 30. 2000, London, ROYAUME-UNI: Informa Healthcare.
155. Hasplova, K., *et al.*, *DNA alkylation lesions and their repair in human cells: modification of the comet assay with 3-methyladenine DNA glycosylase (AlkD)*. *Toxicol Lett*, 2012. **208**(1): p. 76-81.
156. Lacaze, E., *et al.*, *Genotoxicity assessment in the amphipod Gammarus fossarum by use of the alkaline Comet assay*. *Mutat Res*, 2010. **700**(1-2): p. 32-8.

157. Stang, A. and I. Witte, *Performance of the comet assay in a high-throughput version*. *Mutat Res*, 2009. **675**(1-2): p. 5-10.
158. Siddique, H.R., *et al.*, *Validation of Drosophila melanogaster as an in vivo model for genotoxicity assessment using modified alkaline Comet assay*. *Mutagenesis*, 2005. **20**(4): p. 285-90.
159. Kim, H.-J., H.-S. Chun, and R. Yang, *Inhibition of benzo[a]pyrene-induced cytotoxicity and cytochrome P450 1A activity by dietary flavonoids in human liver cell model: structure-activity relationship*. *Biotechnology Letters*, 2000. **22**(24): p. 1941-1946.
160. Collins, A.R., *Investigating oxidative DNA damage and its repair using the comet assay*. *Mutat Res*, 2009. **681**(1): p. 24-32.
161. Majer, B.J., *et al.*, *Coffee diterpenes prevent the genotoxic effects of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP) and N-nitrosodimethylamine in a human derived liver cell line (HepG2)*. *Food Chem Toxicol*, 2005. **43**(3): p. 433-41.
162. Cristina Marcarini, J., *et al.*, *Investigation of cytotoxic, apoptosis-inducing, genotoxic and protective effects of the flavonoid rutin in HTC hepatic cells*. *Experimental and Toxicologic Pathology*, 2011. **63**(5): p. 459-465.
163. Kim, G.N. and H.D. Jang, *Protective mechanism of quercetin and rutin using glutathione metabolism on HO-induced oxidative stress in HepG2 cells*. *Ann N Y Acad Sci*, 2009. **1171**: p. 530-7.
164. Woo, H.H., B.R. Jeong, and M.C. Hawes, *Flavonoids: from cell cycle regulation to biotechnology*. *Biotechnol Lett*, 2005. **27**(6): p. 365-74.
165. Dusinska, M. and A.R. Collins, *The comet assay in human biomonitoring: gene-environment interactions*. *Mutagenesis*, 2008. **23**(3): p. 191-205.
166. Morley, N., *et al.*, *UVA-induced apoptosis studied by the new apo/necro-Comet-assay which distinguishes viable, apoptotic and necrotic cells*. *Mutagenesis*, 2006. **21**(2): p. 105-14.
167. Bezerra, D.P., *et al.*, *Evaluation of the genotoxicity of piplartine, an alkamide of Piper tuberculatum, in yeast and mammalian V79 cells*. *Mutat Res*, 2008. **652**(2): p. 164-74.
168. Vasconcellos, M.C., *et al.*, *Evaluation of the cytotoxic and antimutagenic effects of biflorin, an antitumor 1,4 o-naphthoquinone isolated from Capraria biflora L*. *Arch Toxicol*, 2010. **84**(10): p. 799-810.
169. Vasconcellos, M.C., *et al.*, *The in-vitro and in-vivo inhibitory activity of biflorin in melanoma*. *Melanoma Res*, 2011. **21**(2): p. 106-14.
170. Munari, C.C., *et al.*, *Evaluation of the genotoxic and antigenotoxic potential of Baccharis dracunculifolia extract on V79 cells by the comet assay*. *Journal of Applied Toxicology*, 2010. **30**(1): p. 22-28.

# ANEXOS

**ANEXO 1. Bitácora de registro de peso y grupos de experimentación para la administración.**

Agente Mutagénicos:

Horario:

hrs

Gp o.	No. ratón	Peso	Dosis de Admon.	Fecha y Hora de Admon.	Fecha y hora de sacrificio	Observaciones
Testigo –	1					
	2					
	3					
	4					
	5					
	6					
Control <i>J. dioica</i>	1					
	2					
	3					
	4					
	5					
	6					
Control mutágeno	1					
	2					
	3					
	4					
	5					
	6					
Exp. 1	1					
	2					
	3					
	4					
	5					
	6					
Exp. 2	1					
	2					
	3					
	4					
	5					
	6					
Exp. 3	1					
	2					
	3					
	4					
	5					
	6					

## ANEXO 2. Bitácora de registro para el Corrimiento electroforético

Fecha: \_\_\_\_\_

Lugar: \_\_\_\_\_

Horario: \_\_\_\_\_ hrs

No. De Muestras: \_\_\_\_\_

Capacidad de cámara \_\_\_\_\_

No de Corrim.: \_\_\_\_\_

No.	Colocación de laminillas en la cámara	30 min de suspensión en Buffer de electroforesis pH>13	20 min de corrimiento con Fuente de Poder, 23V, 300mA	Enjuague con Buffer de Neutralización		
				1°	2°	3°
1						
2						
3						
4						
5						
6						
7						
8						
9						

### ANEXO 3. Bitácora de lectura de laminillas en microscopio de epifluorescencia

Fecha: \_\_\_\_\_

Horario de Admon. a leer \_\_\_\_\_

Horario	Laminilla	Clasificación de daño					Total	Índice de daño (ID)	Promedio de ID	Momento de cola	Longitud de cola
		0 Sin daño	1 Daño bajo	2 Daño medio	3 Daño alto	4 Daño total					
Agua	H1 Az										
	H2 Az										
	H4 Az										
	H5 Az										
	H6 Az										
	R1Az										
	R2Az										
	R3Az										
	R4Az										
	R6Az										
	M2 Az										
	M3 Az										
	M4 Az										
	M5 Az										
M6 Az											
DJD	H1 Rj										
	H2 Rj										
	H4 Rj										
	H5 Rj										
	H6 Rj										
	R1 Rj										
	R2 Rj										
	R4 Rj										
	R5 Rj										
	R6 Rj										
	M2 Rj										
	M3 Rj										
	M4 Rj										
	M5 Rj										
M6 Rj											
Mutágeno	H2 Ng										
	H3 Ng										
	H4 Ng										
	H5 Ng										
	H6 Ng										
	R2 Ng										
	R3 Ng										
	R4 Ng										
	R5 Ng										
	R6 Ng										
	M2 Ng										
	M3 Ng										
	M4 Ng										
	M5 Ng										
M6 Ng											

DDB	H2 V												
	H3 V												
	H4 V												
	H5 V												
	H6 V												
	R1 V												
R3 V													
R4 V													
R5 V													
R6 V													
M2 V													
M3 V													
M4 V													
M5 V													
M6 V													
DDM	H2 F												
	H3 F												
	H4 F												
	H5 F												
	H6 F												
	R2 F												
	R3 F												
	R4 F												
	R5 F												
	R6 F												
	M2 F												
	M3 F												
	M4 F												
	M5 F												
M6 F													
DDA	H2 Cf												
	H3 Cf												
	H4 Cf												
	H5 Cf												
	H6 Cf												
	R2 Cf												
	R3 Cf												
	R4 Cf												
	R5 Cf												
	R6 Cf												
	M1 Cf												
	M2 Cf												
	M3 Cf												
	M4 Cf												
	M5 Cf												

## XII. GLOSARIO DE TERMINOS

**Ácido nucleico:** Molécula como el DNA o el RNA capaz de almacenar información genética.

**Antioxidantes:** Grupo de vitaminas, minerales y enzimas que ayudan a combatir los radicales libres que están presentes en nuestro cuerpo, disminuyendo el proceso de envejecimiento.

**Apoptosis:** Muerte celular programada, caracterizada por una serie de eventos celulares regulados que resultan en la muerte celular, para eliminar una célula dañada o una célula normal que deja de ser necesaria para el desarrollo.

**Bromuro de etidio (BrEt):** Agente intercalante usado comúnmente como marcador de ácidos nucleicos en laboratorios de biología molecular para procesos como la electroforesis en gel de agarosa. Cuando se expone esta sustancia a luz ultravioleta, emite una luz roja-anaranjada, que se intensifica unas 20 veces después de haberse unido a una cadena de ADN. Este efecto es debido al aumento de la hidrofobia del medio, y no a la rigidificación del anillo bencénico, no estando éste entre pares de bases del ADN.

**Decocción:** Bebida medicinal hecha de vegetales u otras sustancias tras haber sido hervidas, su objeto es disolver las sustancias de un cuerpo y extenderlas en un vehículo conveniente. Solo se ponen en decocción las sustancias que al grado de calor necesario para hervir no dejan evaporar sus partes esencialmente medicinales.

**Diterpenos:** Compuestos caracterizados por poseer una estructura básica de 20 carbonos y proceder del precursor 2E, 6E, 10E-geranilgeranilpirofosfato (GGPP), presentando una gran variabilidad estructural. Pueden dividirse en dos grandes grupos, compuestos acíclicos y compuestos ciclados.

**DNA (ácido desoxirribonucleico):** la molécula que contiene la información genética primaria en la forma de una secuencia lineal de nucleótidos en grupos de tres (tripletes).

**Electroforesis:** (Tiselius, 1937) procedimiento para la separación de moléculas basado en su diferente velocidad de migración en un campo eléctrico. Como medio de soporte se usan

geles formados por sustancias como el almidón, la agarosa, la acrilamida, etc. Hay modificaciones técnicas que permiten un mayor poder de discriminación.

**Ensayo cometa (electroforesis en gel de células individuales, (SCGE)):** Ensayo rápido, sensible y un método relativamente simple para detectar daños en el DNA a nivel de células individuales. Combina la simplicidad de técnicas bioquímicas para detectar roturas en la cadena del DNA sencillas y sitios de reparación de escisión incompleta, sitios álcali-lábiles y entrecruzamiento con el enfoque de células individuales de pruebas citogenéticas.

**Fitoquímicos:** Compuestos bioactivos, metabolitos secundarios, carentes de valor nutritivo, sintetizados de manera natural, como mecanismo de defensa ante la ingestión de herbívoros como artrópodos, insectos y microorganismos

**Longitud de la cola (TL):** Longitud de migración del DNA, determinado por el analizador de imágenes medido en micrómetros ( $\mu\text{m}$ ).

**Medicina Tradicional:** Es la suma completa de conocimientos, técnicas y prácticas fundamentadas en teorías, creencias y experiencias propias de diferentes culturas utilizadas para mantener la salud, prevenir, diagnosticar, mejorar y tratar trastornos físicos y mentales.

**Momento de la cola (TM):** Definido como el porcentaje de DNA en la cola multiplicado por la longitud entre el centro de la cabeza y la cola, medido en unidades arbitrarias.

**Mutágeno:** (latín, "origen del cambio") es un agente físico, químico o biológico que altera o cambia la información genética (usualmente ADN) de un organismo y ello incrementa la frecuencia de mutaciones por encima del nivel natural.

**Quimioprotección:** (Sporn, 1976) Potenciación farmacológica o fisiológica mediante las cuales la progresión de una lesión preneoplásica puede ser prevenida, detenida o revertida.

**Reparación del ADN:** Conjunto de procesos por los cuales una célula identifica y corrige daños hechos a las moléculas de ADN que codifican el genoma.