



**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO**

**Evaluación de la capacidad antigenotóxica,
antioxidante e inmunoestimulante de pteropodina
y beta-sitosterol**

TESIS
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR
EN CIENCIAS QUIMICOBIOLOGICAS

PRESENTA
M. en C. ROGELIO PANIAGUA PÉREZ



DIRECTORES
DR. EDUARDO MADRIGAL BUJAIAR
DRA. ROSA ISELA ÁLVAREZ GONZÁLEZ

México, D. F., Mayo de 2010

Genotoxic and Cytotoxic Studies of Beta-Sitosterol and Pteropodine in Mouse

R. Paniagua-Pérez,¹ E. Madrigal-Bujaidar,² S. Reyes-Cadena,¹ D. Molina-Jasso,²
J. Pérez Gallaga,¹ A. Silva-Miranda,¹ O. Velazco,¹ N. Hernández,¹ and G. Chamorro³

¹Laboratorio de Bioquímica, Centro Nacional de Rehabilitación/Medicina de Rehabilitación, México DF 14389, Mexico

²Laboratorio de Genética, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, IPN, México DF 11340, Mexico

³Laboratorio de Toxicología Preclínica, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, IPN, México DF 11340, Mexico

Received 16 December 2004; revised 18 March 2005; accepted 21 March 2005

Beta-sitosterol (BS) and pteropodine (PT) are constituents of various plants with pharmacological activities potentially useful to man. The chemicals themselves possess biomedical properties related to the modulation of the immune and the nervous systems, as well as to the inflammatory process. Therefore, safety evaluation of the compounds is necessary in regard to their probable beneficial use in human health. The present study evaluates their genotoxic and cytotoxic potential by determining the capacity of the compounds to induce sister chromatid exchanges (SCE), or to alter cellular proliferation kinetics (CPK) and the mitotic index (MI) in mouse bone marrow cells. Besides, it also determines their capacity to increase the rate of micronucleated polychromatic erythrocytes (MNPE) in peripheral mouse blood, and the relationship polychromatic erythrocytes/normochromatic erythrocytes (PE/NE) as an index of cytotoxicity. For the first assay, four doses of each compound were tested: 200, 400, 600, and 1000 mg/kg in case of BS, and 100, 200, 300, and 600 mg/kg for PT. The results in regard to both agents showed no SCE increase induced by any of the tested doses, as well as no alteration in the CPK, or in the MI. With respect to the second assay, the results obtained with the two agents were also negative for both the MNPE and the PE/NE index along the daily evaluation made for four days. In the present study, the highest tested dose corresponded to 80% of the LD₅₀ obtained for BS and to 78% in the case of PT. The results obtained establish that the studied agents have neither genotoxic nor cytotoxic effect on the model used, and therefore they encourage studies on their pharmacological properties.

INTRODUCTION

The isolation and chemical characterization of plant-derived compounds with therapeutic or other beneficial health properties are increasing, in many cases as a consequence of primary information obtained through the use of plant extracts in traditional medicine. However, the possible use of these compounds for human well-being requires solid and lengthy research which includes a number of basic and applied phases; one of the determinations in this complex evaluation concerns the toxic potential of the studied agent.

Beta-sitosterol (BS) (Figure 1) is one of the most prevalent vegetable-derived phytosterols in the diet. It is

structurally related to cholesterol, but since it is slowly absorbed in the intestinal tract, it may interfere with the cholesterol absorption preventing its rise in serum. BS also appears to modulate the immune function, inflammation, and the pain levels by controlling the production of inflammatory cytokines [1, 2]. This last effect may help to control allergies and reduce prostate enlargement [3, 4]. The compound can affect the structure of cell membranes and alters the signaling pathways that regulate tumor growth and apoptosis [5]. Moreover, BS has shown a decrease in proliferative changes and tumor yields when added to diets of mice and rats treated with colon carcinogens [6, 7]. The compound is found in numerous plants, including rice, wheat, corn, nut, peanut, and particularly in the Peruvian borne Rubiaceae plant cat's claw (*Uncaria tomentosa*) [8, 9], where it seems to be involved in the curative properties suggested for the vegetable, such as anti-inflammatory and antiviral activities, enhancer of the immune system, and inhibitor of arthritis, ulcer, and cancer [10, 11, 12, 13].

Pteropodine or uncarine C (PT) (Figure 1) is a chemical specifically isolated from cat's claw. It is a heteroyohimbine-type oxindole whose biological properties have been studied less than those of BS. However,

Correspondence and reprint requests to E. Madrigal-Bujaidar, Laboratorio de Genética, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, IPN, México DF 11340, Mexico, E-mail: eduardo.madrigal@lycos.com

This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Cell protection induced by beta-sitosterol: inhibition of genotoxic damage, stimulation of lymphocyte production, and determination of its antioxidant capacity

R. Paniagua-Pérez · E. Madrigal-Bujaidar · S. Reyes-Cadena ·
I. Álvarez-González · L. Sánchez-Chapul · J. Pérez-Gallaga · N. Hernández ·
G. Flores-Mondragón · O. Velasco

Received: 26 June 2007 / Accepted: 20 December 2007 / Published online: 6 February 2008
© Springer-Verlag 2008

Abstract Beta-sitosterol (BS) is a compound that has shown various activities potentially useful for human health. In the present study, we determined its antigenotoxic capacity and lymphocyte induction potential in mouse as well as its capacity to trap free radicals in vitro. BS, in doses from 200 to 1,000 mg/kg, was able to significantly reduce the frequency of sister chromatid exchanges induced by 10 mg/kg of doxorubicin (DX) in bone marrow cells. The same range of BS doses also gave rise to a strong reduction in the rate of micronucleated, polychromatic erythrocytes induced by DX. In addition, we determined an increase in the production of lymphocytes in mice administered with BS. By means of the DPPH assay, the compound was shown to trap free radicals in a concentration dependent manner as high as 78.12% using 250 µg/ml. Our research established three relevant biological activities of BS which show its potential as a chemopreventive agent.

Keywords Beta-sitosterol · Doxorubicin · Antigenotoxicity · Antioxidant

R. Paniagua-Pérez · S. Reyes-Cadena · L. Sánchez-Chapul ·
J. Pérez-Gallaga · N. Hernández · G. Flores-Mondragón ·
O. Velasco
Laboratorio de Bioquímica Muscular, Instituto Nacional
de Rehabilitación, Av. México-Xochimilco 289, Arenal
de Guadalupe, CP. 14389 Mexico, D.F., Mexico

E. Madrigal-Bujaidar (✉) · I. Álvarez-González
Laboratorio de Genética, Escuela Nacional de Ciencias
Biológicas, I.P.N., Carpio y Plan de Ayala. Santo Tomas,
CP. 11340 Mexico, D.F., Mexico
e-mail: eduardo.madrigal@lycos.com

Introduction

Phytosterols are a group of chemicals found in a variety of vegetables, including those that produce different grains, seeds, and fruits. These compounds are usually consumed by humans as ingredients in vegetable oils or in their industrialized products (Tapiero et al. 2003). About 44 phytosterols have been identified to date, and of these, beta-sitosterol (BS), campesterol, and stigmasterol are the most abundant. The chemical structure of BS, in particular, resembles that of cholesterol except for the presence of an ethyl group at the 24 carbon position of the side chain (Ling and Jones 1995) (Fig. 1). The glucoside of BS (sitosterolin) and the sterol are usually found together, the ratio being approximately 90:10% sterol/sterolin, although the level of sterolin may be higher, as in the case of the Rubiaceae plant *Uncaria tomentosa* (cat's claw) (Pegel 1997).

The cholesterol lowering ability of phytosterols has already been reported, both in experimental and clinical trials (Haydn Pritchard et al. 2003; Chen 2001). Likewise, BS has been shown to participate in the transformation of omega 6 fatty acids into prostaglandins and leukotrienes, compounds that are involved in immune support, reduction of thrombo-embolic disorders and a decline in the amount of inflammatory metabolites (Bouic et al. 1999).

The plant, cat's claw, is known to possess as much as 80% of BS. Therefore, this chemical has been suggested as one of the curative principles in the plant used for hypercholesterolemia and inflammation, modulation of immunity, and cancer treatment (Keplinger et al. 1999; Aguilar et al. 2002). Furthermore, in vitro assays with cat's claw extracts have revealed a significant antimutagenic effect (Rizzi et al. 1993).

Antigenotoxic, Antioxidant and Lymphocyte Induction Effects Produced by Pteropodine

Rogelio Paniagua-Pérez¹, Eduardo Madrigal-Bujaidar², Dolores Molina-Jasso², Susana Reyes-Cadena¹, Isela Álvarez-González², Laura Sánchez-Chapul¹ and Javier Pérez-Gallaga¹

¹Laboratory of Muscular Biochemistry, National Institute of Rehabilitation and ²Laboratory of Genetics, National School of Biological Sciences, I.P.N., Carpio y Plan de Ayala s/n, Sto. Tomás, D.F., Mexico

(Received June 12, 2008; Accepted August 24, 2008)

Abstract: Pteropodine is a heterohimbine-type oxindole alkaloid specifically isolated from 'Cat's claw' (*Uncaria tomentosa*), a plant that has shown cytostatic, anti-inflammatory and antimutagenic properties and is used in traditional medicine to cure a number of diseases. In this report, we studied the ability of pteropodine to decrease the rate of sister-chromatid exchanges and micronucleated polychromatic erythrocytes in mice administered doxorubicin. We also determined its capacity to induce lymphocyte production in mice as well as its free radical scavenging potential by applying the DPPH assay. We found pteropodine (100–600 mg/kg) to significantly decrease the frequency of sister-chromatid exchanges and micronucleated polychromatic erythrocytes in mice administered with 10 mg/kg of doxorubicin. Furthermore, we determined that pteropodine partially corrected bone marrow cytotoxicity induced by doxorubicin, as it showed an improvement in the rate of polychromatic erythrocytes. Besides, 600 mg/kg of pteropodine increased 25.8% of the production of lymphocytes over the control value along a 96-hr assay, and it exhibited a strong capacity to trap the DPPH-free radical (98.26% with 250 µg/ml). Our results establish that pteropodine is an effective antimutagen in the model used, and suggest that pteropodine deserves further research in the area of cell protective potential and its mechanism of action.

Uncaria tomentosa, commonly known as 'Cat's claw', is a Rubiaceae plant native to Peru that is used in traditional medicine to treat several health disorders, such as arthritis, bursitis, rheumatism, herpes, allergies, ulcers, candidiasis, menstrual disorders, bowel and intestinal disorders, HIV infection, different types of cancer. It is also used as adjuvant in chemotherapy or radiotherapy. For these purposes the bark or root is usually prepared as infusion, or both are also used in extracts or tinctures [1,2]. Research on the biomedical properties of the plant has confirmed its stimulating action on the immune function as well as its cytostatic, anti-inflammatory and antimutagenic effects [3–6]. A further investigation has revealed its antiproliferative activity on the growth of the human breast cancer cell line MCF7 [7].

A number of constituents of the plant have been identified and chemically characterized. These include quinovic acid glycosides, oxindole alkaloids, proanthocyanidins, polyphenols, triterpenes, and sterols such as β -sitosterol, stigmasterol and campesterol [8–11]. Six oxindole alkaloids have been isolated from the plant, including pteropodine also called uncarine C (fig. 1), which is a heterohimbine-type oxindole that has been reported to show an apoptotic effect in leukaemic lymphoblasts and to participate in the improvement of memory impairment induced by the dysfunction of cholinergic

systems in the brain of mice [12–15]. These data suggest that pteropodine could act synergistically with other constituents of *U. tomentosa* in one or more of the reported actions of the plant.

Based on the abovementioned information, our laboratory has undertaken the evaluation of the genotoxic and antigenotoxic potential of β -sitosterol and pteropodine. In an earlier study, we found that neither of the two compounds produced genotoxicity in mouse [16]. We have also determined that β -sitosterol protects mouse cells from the DNA damage induced by doxorubicin, and that it is a lymphocyte inducer and a free radical scavenging agent [17]. With respect to pteropodine, we have found no information

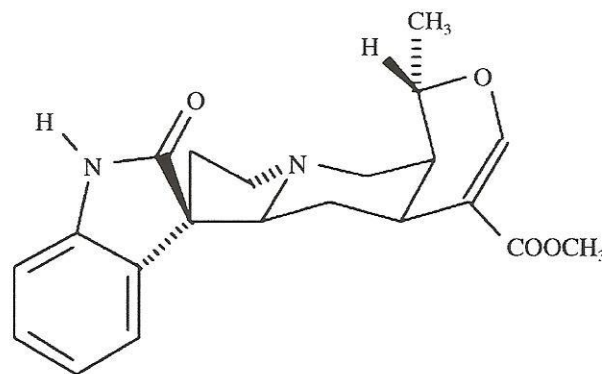


Fig. 1. Chemical structure of pteropodine.

Author for correspondence: Eduardo Madrigal-Bujaidar, Laboratory of Genetics, National School of Biological Sciences, I.P.N., Carpio y Plan de Ayala, Sto. Tomás, México D.F., cp 11340, Mexico (fax +55 53 96 35 03, e-mail eduardo.madrigal@lycos.com).



Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Genética de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del IPN y en el Laboratorio de Bioquímica Muscular del Instituto Nacional de Rehabilitación de la SSA y estuvo bajo la dirección del Dr. Eduardo Madrigal Bujaidar y la Dra. Rosa Isela Álvarez González y para lo cual se contó con el apoyo como becario de CONACYT.



DEDICATORIAS

A mi Madre Enedina Pérez Pérez:

Ejemplo claro de sabiduría, fortaleza inagotable, admiración, perseverancia, dedicación, libertad y bondad. Y porque todo lo que soy y espero ser se lo debo a ella, quien siempre me apoya en mis metas y está presente en todos mis momentos. Te adoro Madre, gracias por existir.

A mi Padre Teódulo Paniagua Chanona:

Ejemplo claro de nobleza y humildad, y aunque físicamente no estás conmigo, siento tu presencia y tu esencia a lado mío. Te amo padre, me quedaron tus enseñanzas

A mis hermanos:

Choni, Belly, Filogonio (q.e.p.d), Acacio, Raúl, Lilia, Hugui, Sael, Mayi, y Dori, su apoyo y amor incondicional lo guardo en mi corazón como un tesoro invaluable.

A mis sobrinos:

Amor demostrado siempre, ustedes han sido mi inspiración y mi mejor aliciente para continuar; los amo a todos.

AGRADECIMIENTOS

AL Dr. Eduardo Madrigal Bujaidar, por su paciencia e insistencia constante, y sobre todo por su apoyo personal y académico para que lograra concluir con esta meta.

A mis maestros y sinodales, Dra. Susana Reyes Cadena, Dra. Rosa Isela Álvarez González, Dr. Germán Chamorro Cevallos, Dra. Leticia Garduño Siciliano, Dra. Laura Sánchez Chapul y Dr. Benjamín Nogueta Torres, por su orientación y gran ayuda.

Al CONACYT por el apoyo económico como becario durante el doctorado y al IPN por brindarme la oportunidad de cursar el doctorado.

Un especial agradecimiento a mi gran amigo y hermano Refugio González Zepeda, y su familia (mi otra familia), porque me han demostrado su amistad y su apoyo en cada momento bueno y más aún en los malos y peores.

A mi hermana adoptiva y amiga Lucía Arista, te agradezco que estés siempre a mi lado, dispuesta siempre a apoyarme y al pendiente de mi persona, tu apoyo es algo que valoro enormemente.

A mis amigos y compañeros, Lolita Molina, Gabi Flores, Norma Hernández, Javier Pérez, Ricardo Mejenes, Efrén Alatorre, Oscar Velasco, Celia Reyes, Fernando Uribe, Martín Páez, Adriana Trejo, Norman Ochoa, Susi Verde y Martín, por animarme y apoyarme siempre en mis proyectos.

A los que se han adelantado en el camino, José Luís y René, sé que en donde están, les dará gusto verme alcanzar esta importante meta de mi vida, cuando partieron empezaron a vivir en mis pensamientos.

A TODOS MIL GRACIAS

INDICE GENERAL DE CONTENIDO

	Página
INDICE DE FIGURAS Y ESQUEMAS	I
INDICE DE TABLAS	II
LISTA DE ABREVIATURAS	III
RESUMEN	VI
ABSTRACT	VII
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. GENOTOXICIDAD	1
1.2. MUTAGÉNESIS	2
1.3. ALTERACIONES DEL DNA Y AGENTES INDUCTORES.	2
1.4. ANTIMUTAGÉNESIS	4
1.5. SISTEMAS DE PRUEBAS PARA IDENTIFICAR LESIONES GENOTÓXICAS	6
1.5.1. PARA DETECTAR MUTACIONES GÉNICAS	6
1.5.3. PARA DETECTAR DAÑO PRIMARIO AL DNA	6
1.5.3.1. INTERCAMBIO DE CROMÁTIDAS HERMANAS	6
1.5.3.2. MICRONÚCLEOS	8
6. DOXORRUBICINA	9
1.7. RADICALES LIBRES	9
1.8. ANTIOXIDANTES	11
1.9. INMUNOGENÉTICA Y SU RELACIÓN CON LA PROTECCIÓN CELULAR	12
1.10. LINFOCITOS	13
1.11. MEDICINA TRADICIONAL Y <i>Uncaria tomentosa</i>	15
1.12. OXINDOLES PENTACÍCLICOS	17
1.13. ESTEROLES	18

1.14. BETA-SITOSTEROL	20
2. JUSTIFICACIÓN	20
3. HIPÓTESIS	21
4. OBJETIVOS	21
4.1. OBJETIVO GENERAL	21
4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	21
5. MATERIAL	22
5.1. Material	22
5.1.1. Material biológico	22
5.1.2. Material de laboratorio y equipo	22
5.1.3. Soluciones y colorantes	22
6. METODOLOGÍA	22
6.1. DETERMINACIÓN DE LA DOSIS LETAL CINCUENTA (DL50) DE PTEROPODINA Y BETA-SITOSTEROL.	23
6.2. DISTRIBUCIÓN DE LOS GRUPOS EXPERIMENTALES	23
6.3. TÉCNICA DE INTERCAMBIOS DE CROMÁTIDAS HERMANAS	25
6.3.1. Obtención de la médula ósea del ratón	25
6.3.2. Tinción diferencial de las cromátidas	26
6.3.3. Observación microscópica	26
6.3.4. Análisis estadístico	27
6.4. TÉCNICA DE MICRONÚCLEOS	27
6.5. RECUENTO DIFERENCIAL DE LINFOCITOS	28
6.7. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE PTEROPODINA Y BETA-SITOSTEROL IN VITRO	29
7. RESULTADOS	30
7.1. PTEROPODINA	30
7.1.1. EVALUACIÓN GENOTÓXICA	30
7.1.2. EVALUACION ANTIGENÓTOXICA.	32

7.1.3. DETERMINACION DE LINFOCITOS TOTALES EN SANGRE PERIFÉRICA	34
7.1.4. DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE	34
7.2. BETA-SITOSTEROL	35
7.2.1. EVALUACIÓN GENOTOXICA	35
7.2.2. EVALUACION ANTIGENOTÓXICA DE BETA-SITOSTEROL	36
7.2.3. DETERMINACION DE LINFOCITOS TOTALES EN SANGRE PERIFÈRICA	38
8. DISCUSION	39
8.1. GENERAL	39
8.2. DOSIS LETAL 50	40
8. 4. EFECTOS BIOLÓGICOS DE PTEROPODINA	46
8.4.1. EFECTO ANTIGENOTOXICO	46
8.4.2. EFECTO ANTIOXIDANTE	47
8.4.3. EFECTO INMUNOLÓGICO	50
8.5.2. EFECTO ANTIOXIDANTE	53
8.5.3. EFECTO INMUNOESTIMULANTE	54
9. BIBLIOGRAFÍA	54

INDICE DE FIGURAS Y ESQUEMAS

	Página
Figura 1. Esquema de los efectos de las mutaciones	2
Figura 2. Anomalías estructurales cromosómicas	3
Figura 3: Intercambio de cromátidas hermanas	7
Figura 4. Célula	9
Figura 5. Doxorrubicina	10
Figura 7. Respuesta celular y humoral a antígenos	12
Figura 6. Estrés oxidativo y daño celular y al ADN	13
Figura 8. Linfocitos B y Linfocitos T	15
Figura 9. Estructura química de pteropodina	17
Figura 10. Esteroles	19
Figura 11. Estructura química de beta-sitosterol	20
Figura 12. Esquema del desarrollo de la técnica de intercambio de cromátidas hermanas	26
Figura 13. Cromosoma obtenido con la técnica de ICH	27
Figura 14: Eritrocito policromático observado en microscopio electrónico	28
Figura 15: Linfocitos observados en frotis sanguíneo de ratón	29

INDICE DE TABLAS:

Tabla A: Dosis administradas de Pteropodina	24
Tabla B: Dosis administradas de Beta-sitosterol	24
Tabla 1. Frecuencia de ICH, cinética de proliferación e índice mitótico en médula ósea de ratones administrados con pteropodina	30
Tabla 2. Frecuencia de micronúcleos en ratones tratados con pteropodina y doxorubicina	31
Tabla 3. Frecuencia de eritrocitos policromáticos en la relación EPC/ENC de ratones tratados con pteropodina y doxorubicina	31
Tabla 4. Intercambio de cromátidas hermanas (ICH), tiempo promedio de generación (TPG), e índice mitótico (IM) en médula ósea de ratón administrados con pteropodina (PT) y doxorubicina (DR)	32
Tabla 5. Frecuencia de micronúcleos (MN) en ratones administrados con pteropodina (PT) y doxorubicina (DR)	33
Tabla 6. Frecuencia de eritrocitos policromáticos en la relación eritrocitos normocrómicos (EPC/ENC) de ratones tratados con pteropodina (PT) y doxorubicina (DR)	33
Tabla 7. Frecuencia de linfocitos totales en ratones tratados con pteropodina (PT)	34
Tabla 8. Efecto in vitro del barrido del radical libre de pteropodina por método de DPPH	34
Tabla 9. Frecuencia de ICH, cinética de proliferación e índice mitótico en médula ósea de ratones administrados con beta-sitosterol	35
Tabla 10. Frecuencia de micronúcleos en ratones administrados con beta-sitosterol y Doxorubicina	36

Tabla 11. Frecuencia de eritrocitos policromáticos en la relación EPC/ENC de ratones tratados con beta-sitosterol y doxorubicina	36
Tabla 12. Intercambio de cromátidas hermanas (ICH), tiempo promedio de generación (TPG), e índice mitótico (IM) en médula osea de ratón administrados con beta- sitosterol (BS) y doxorubicina (DR)	37
Tabla 13. Frecuencia de micronúcleos (MN) en ratones administrados con beta-sitosterol (BS) y doxorubicina (DR)	38
Tabla 14. Frecuencia de eritrocitos policromáticos en la relación eritrocitos normocrómicos (EPC/ENC) de ratones tratados con beta-sitosterol (BS) y doxorubicina (DR)	38
Tabla 15. Frecuencia de linfocitos totales en ratones tratados con beta-sitosterol (BS)	39
Tabla 16. Efecto in vitro del barrido del radical libre de beta-sitosterol por método de DPPH	39

LISTA ABREVIATURAS

RNA: ácido ribonucleico

DNA: ácido desoxirribonucleico

ICAM-1: molécula intrínseca de adherencia tipo 1

Bu: 5-bromouracilo

AP: 2-aminopurina

NADPH: nicotinamida adenina dinucleótido

OH: Hidroxilo

RL: radicales libres

ERO: especies reactivas de oxígeno

UT: Uncaria tomentosa

EPA: Environmental Protection Agency

ICH: Intercambio de cromátides hermanas

5BrdU: 5-bromodesoxiuridina

Fig. : figura

MN: Micronúcleos

EPC: eritrocitos policromáticos

DPPH: 1,1-difenil-2-picrilhidrazil

KCl: Cloruro de potasio

IP: intraperitoneal

DL50: dosis letal cincuenta

PT: pteropodina

BS: beta-sitosterol

ARNasa: ribonucleasa

GATC: guanina, adenosina, tirosina, citosina

Dox: doxorubicina

ANVA: análisis de varianza

DPPH: 1,1-difenil-2-picrilhidrazilo

EC 50: concentración efectiva 50)

mg: miligramo

nm: nanómetro

ml: mililitro

hr: hora

mg/m²: miligramo por metro cuadrado

g: gramo

mm: milímetro

M: molar

RESUMEN

Beta-sitosterol (BS) y pteropodina (PT) son componentes de diversas plantas con actividades farmacológicas potencialmente útiles para el hombre. Estos compuestos poseen propiedades biomédicas relacionadas con la modulación del sistema inmunitario, el sistema nervioso, así como para procesos inflamatorios. Por lo tanto es necesaria, la evaluación de la seguridad en el uso de estas sustancias con respecto a su probable uso benéfico en la salud humana. El presente trabajo se evaluó en primer término la actividad genotóxica y su potencial citotóxico mediante la determinación de la capacidad de ambos compuestos para inducir intercambio de cromátidas hermanas (ICH), o para alterar el cinética de proliferación celular (CPK) y el índice mitótico (IM) células de médula ósea de ratón. Además, se determinó la capacidad para aumentar la tasa de eritrocitos policromáticos micronucleados (MNPE) en la sangre periférica de ratón y la relación entre eritrocitos policromáticos / eritrocitos normocromáticos (PE/NE) como un índice de citotoxicidad. Después de esta evaluación, se evaluó la capacidad de pteropodina y beta-sitosterol para disminuir la tasa de ICH y MNPE en ratones administrados con doxorubicina (DX). También se determinó la capacidad para inducir la producción de linfocitos en ratones, así como su potencial para atrapar radicales libres mediante la aplicación de la técnica DPPH. Para la primera prueba, se probaron cuatro dosis de cada compuesto: 200, 400, 600 y 1000 mg/kg en caso de BS y 100, 200, 300 y 600 mg/kg para PT. Los resultados en lo que respecta a ambos agentes no mostraron ningún aumento SCE inducida por cualquiera de las dosis probadas, así como no hubo alteración en la CPK, o en el IM. Con respecto a la determinación de la segunda prueba, los resultados obtenidos con los dos agentes también fueron negativos para el MNPE y el índice de PE/NE a lo largo de la evaluación diaria realizada durante cuatro días. En el presente estudio, la mayor dosis probada correspondía al 80% de la DL50 obtenidos para BS y al 78% en el caso de PT. Se comprobó que pteropodina (100-600 mg/kg) disminuye considerablemente la frecuencia de ICH y MNPE en ratones administrados con 10 mg/kg de DX. Además, se determinó que pteropodina parcialmente corregía la citotoxicidad de médula ósea inducida por la doxorubicina, y mostró una mejoría en la tasa de eritrocitos policromáticos. Además, con la dosis de 600 mg/kg de pteropodina hubo un aumento del 25,8% en la producción de linfocitos comparados con el grupo control a lo largo del ensayo de 96 horas, y exhibió una gran capacidad para atrapar el radical libre de DPPH (98.26% con 250 microg/ml). BS, en dosis de 200 a 1.000 mg/kg, fue capaz de reducir significativamente la frecuencia de ICH inducida por 10 mg/kg de DX en las células de la médula ósea. Los mismos rangos de dosis de BS también dieron lugar a una fuerte reducción en la tasa de MNPE por DX. Además, se determinó un aumento en la producción de linfocitos en ratones administrados con BS. Por lo tanto se establece con los resultados obtenidos que los agentes estudiados no tienen actividad genotóxica, ni efecto citotóxico en el modelo utilizado. Por otro lado nuestros resultados establecen que PT es un antimutágeno eficaz en el modelo empleado lo que sugiere más investigaciones en el área de protección y su posible mecanismo de acción. Beta-sitosterol fue demostró capacidad para atrapar a los radicales libres de una manera dependiente a la concentración tan alta como su porcentaje de 78.12 con 250 µg/ml. Nuestra investigación estableció tres actividades biológicas pertinentes de PT y BS que muestran su potencial como agentes quimiopreventivos.

ABSTRACT

Beta-sitosterol (BS) and pteropodine (PT) are constituents of various plants with pharmacological activities potentially useful to man. The chemicals themselves possess biomedical properties related to the modulation of the immune and the nervous systems, as well as to the inflammatory process. Therefore, safety evaluation of the compounds is necessary in regard to their probable beneficial use in human health. The present work evaluates their genotoxic and cytotoxic potential by determining the capacity of the compounds to induce sister chromatid exchanges (SCE), or to alter cellular proliferation kinetics (CPK) and the mitotic index (MI) in mouse bone marrow cells. Besides, it also determines their capacity to increase the rate of micronucleated polychromatic erythrocytes (MNPE) in peripheral mouse blood, and the relationship polychromatic erythrocytes/normochromatic erythrocytes (PE/NE) as an index of cytotoxicity. After this assessment we studied the ability of pteropodine and beta-sitosterol to decrease the rate of sister-chromatid exchanges and micronucleated polychromatic erythrocytes in mice administered doxorubicin (DX). We also determined its capacity to induce lymphocyte production in mice as well as its free radical scavenging potential by applying the DPPH assay. For the first assay, four doses of each compound were tested: 200, 400, 600, and 1000 mg/kg in case of BS, and 100, 200, 300, and 600 mg/kg for PT. The results in regard to both agents showed no SCE increase induced by any of the tested doses, as well as no alteration in the CPK, or in the MI. With respect to the second assay, the results obtained with the two agents were also negative for both the MNPE and the PE/NE index along the daily evaluation made for four days. In the present study, the highest tested dose corresponded to 80% of the LD50 obtained for BS and to 78% in the case of PT. For the second assay we found PT (100-600 mg/kg) to significantly decrease the frequency of SCE and MNPE in mice administered with 10 mg/kg of DX. Furthermore, we determined that pteropodine partially corrected bone marrow cytotoxicity induced by doxorubicin, as it showed an improvement in the rate of polychromatic erythrocytes. Besides, 600 mg/kg of PT increased 25.8% of the production of lymphocytes over the control value along a 96-hr assay, and it exhibited a strong capacity to trap the DPPH-free radical (98.26% with 250 microg/ml). BS, in doses from 200 to 1,000 mg/kg, was able to significantly reduce the frequency of SCE induced by 10 mg/kg of DX in bone marrow cells. The same range of BS doses also gave rise to a strong reduction in the rate of micronucleated, polychromatic erythrocytes induced by DX. In addition, we determined an increase in the production of lymphocytes in mice administered with BS. By means of the DPPH assay. The results obtained establish that the studied agents have neither genotoxic nor cytotoxic effect on the model used. Our results establish that PT is an effective antimutagen in the model used, and suggest that this compound deserves further research in the area of cell protective potential and its mechanism of action. BS was shown to trap free radicals in a concentration dependent manner as high as 78.12% using 250 µg/ml. Our research established three relevant biological activities of PT and BS which show their potential as a chemopreventive agents.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. GENOTOXICIDAD

Todos los organismos vivos están expuestos constantemente a elementos que por sus propiedades físicas, químicas o biológicas, al ser ingeridos, inhalados, aplicados tópicamente o inyectados, son capaces de provocar alteraciones orgánicas, funcionales y aun la muerte. A menudo, las reacciones dependen de la conversión de las sustancias absorbidas en un metabolito activo, lo que puede provocar diversos problemas de salud (1).

En los últimos años ha recibido un gran impulso el estudio de los efectos adversos que causan los químicos al interferir con la síntesis de los ácidos nucleicos, particularmente con el DNA, por sus efectos genotóxicos (2). Estos compuestos pueden reaccionar por sí mismos y actuar directamente, o ser biotransformados por enzimas que los hacen más electrofílicos, lo que incrementa su reactividad, por lo que pueden actuar indirectamente, como promutágenos, a partir de alguno de sus metabolitos. Estos compuestos al interactuar con el DNA pueden causarle daño, lo que se traduce en una mutación o el desarrollo de células cancerígenas (3).

1.2. MUTAGÉNESIS

Mutagénesis se refiere a diversos cambios que se originan en la secuencia de nucleótidos del material genético de los organismos y que puede afectar una célula u organismo en diferentes formas; en otros casos, los cambios afectan la regulación de la expresión de los genes, lo que altera la cantidad de la proteína codificada, por lo que se puede observar sobreproducción, disminución o ausencia total de la proteína involucrada (4).

Se consideran células anormales aquellas que portan una o más mutaciones en cualquiera de sus genes o tienen una alteración cromosómica. Las mutaciones pueden existir tanto en células somáticas como germinales; en el primer caso, puede ocurrir en cualquier momento de la división celular y su efecto se manifiesta en la medida que el material genético involucrado tenga un efecto determinante en el desarrollo o función

de un tejido. En el segundo caso dan como resultado una alteración del funcionamiento celular normal que puede terminar en una transformación maligna (figura 1) (5).

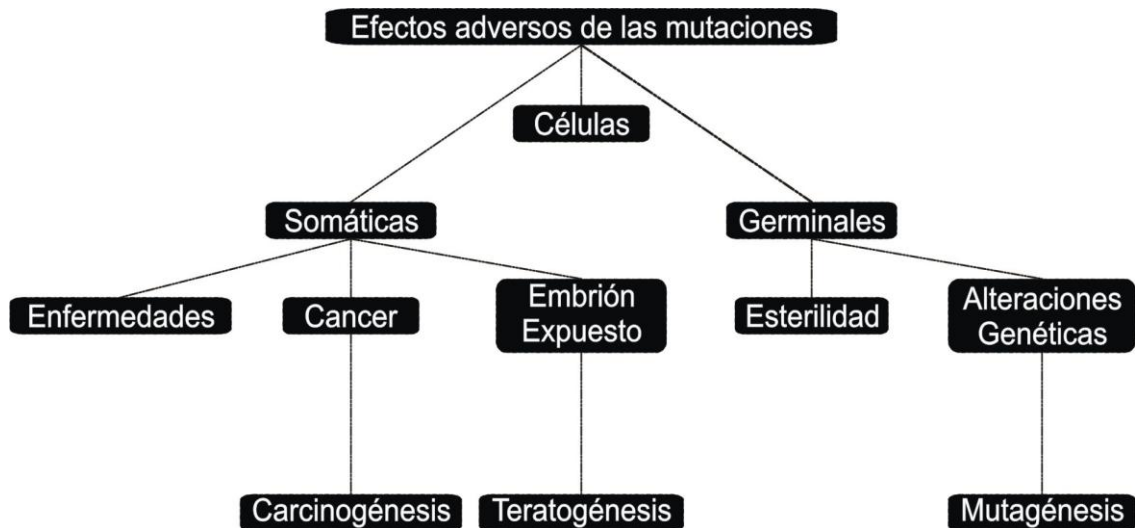


Figura 1. Esquema de los efectos de las mutaciones.

1.3. ALTERACIONES DEL DNA Y AGENTES INDUCTORES.

Existen agentes físicos y químicos, naturales o sintéticos, que pueden dañar la estructura del DNA y causarle una gran variedad de lesiones que pueden ser letales o mutagénicas: la luz ultravioleta, las radiaciones ionizantes, agentes alquilantes, agentes oxidantes y diversos medicamentos, son algunos ejemplos típicos que causan estos efectos. Estos agentes pueden alterar al DNA rompiendo sus cadenas, eliminando bases, o formando aductos (6).

El daño al DNA puede manifestarse en efectos visibles, que son detectados por el análisis citológico de los cromosomas, o en efectos no visibles, que ocurren a nivel de nucleótidos. En el primer caso las macrolesiones pueden corresponder a cambios en el número de cromosomas (ganancia o pérdida) o alteraciones en la estructura cromosómica (fracturas, deleción, rearrreglos), estos son generados por rompimientos con o sin rearrreglo posterior. En el segundo caso se encuentran las microlesiones que

implican adiciones o deleciones de pares de bases, o sustitución de un par de base errónea en el DNA y que en general se clasifican como transición o transversión (7).

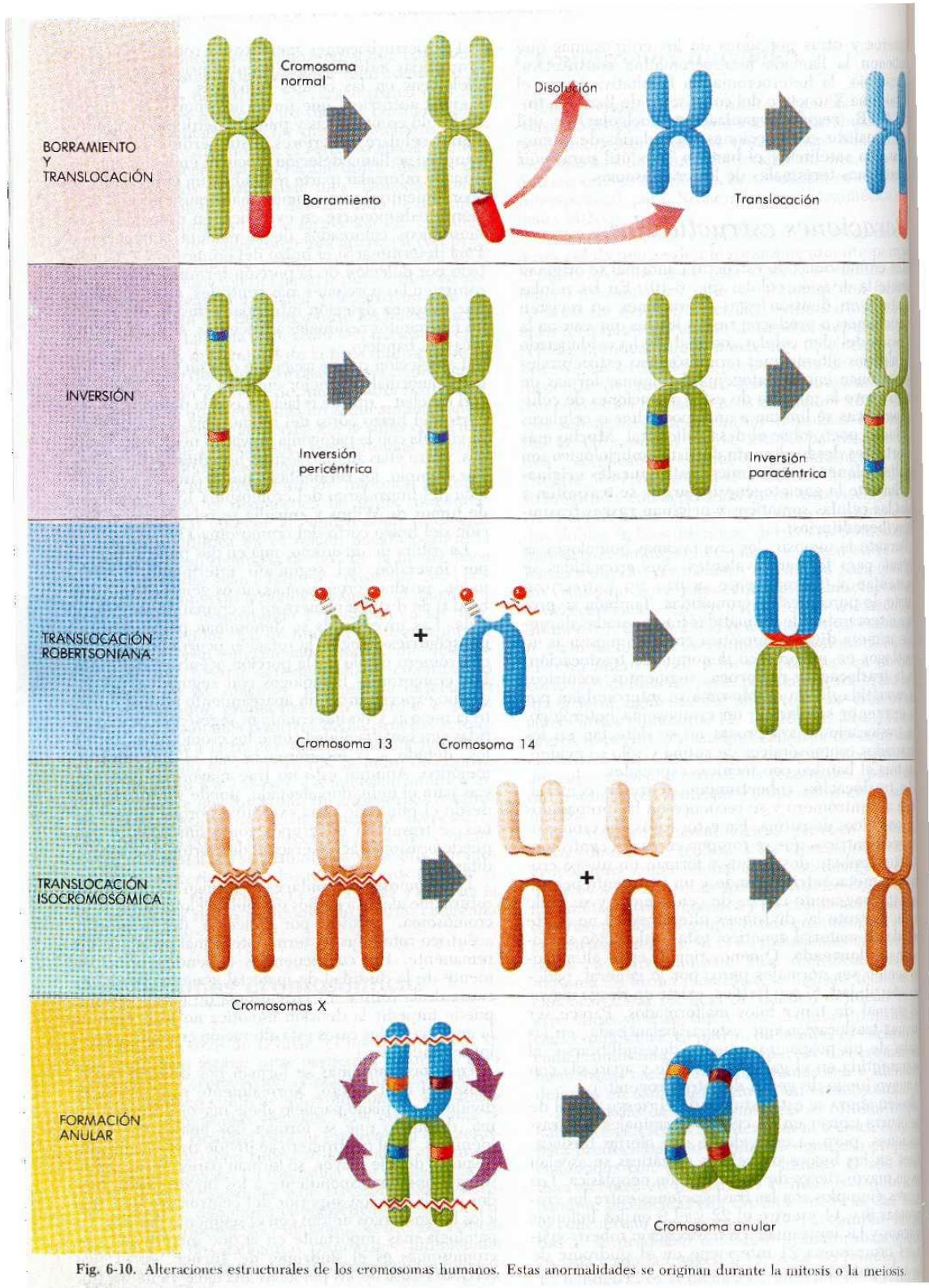


Figura 2. Anomalías estructurales cromosómicas

1.4. ANTIMUTAGÉNESIS

En el transcurso del tiempo, se llegó a la identificación de agentes genotóxicos físicos, químicos y biológicos en prácticamente todas las áreas relacionadas con el hombre: laboral, farmacéutica, alimenticia o de hábitos personales, lo que llevó a una especie de saturación genotóxica y, como consecuencia, a la búsqueda de estrategias para evitar o reducir los efectos negativos de estos agentes. Una primera instancia la proporcionó el propio conocimiento de la capacidad genotóxica de los agentes, de tal manera que dicha información hace posible evitar la exposición a aquellas sustancias que no sean indispensables para el ser humano, también permite sustituir el uso de sustancias mutagénicas por otras inocuas, cuando esto es factible, o bien, modificar la estructura molecular de los mutágenos con la idea de que este cambio elimine el potencial genotóxico (8, 9). En esta búsqueda de soluciones surgió el conocimiento de que en el universo de agentes químicos también se encuentran los antimutágenos o antigenotóxicos, es decir, aquellos agentes que son capaces de reducir o eliminar esos efectos genotóxicos que se presentan en los organismos, independientemente de que éstas sean espontáneas o inducidas (8). El auge de este enfoque se entiende al considerar principalmente tres aspectos: 1) que la genotoxicidad está conectada en gran medida con la carcinogenicidad, por lo que al prevenir la primera también se podría evitar el desarrollo del cáncer, 2) que el origen del cáncer está relacionado, en una alta proporción, con la exposición a agentes ambientales y 3) que los inhibidores de genotoxicidad se han encontrado principalmente en plantas y en componentes de la dieta, lo que sugiere una cierta facilidad para incrementar la exposición a dichos inhibidores y, además, hacerlo en las condiciones apropiadas desde el punto de vista científico (10). En relación al último punto, es conveniente mencionar el señalamiento hecho por Bruce N. Ames en el sentido de que una alimentación insuficiente en frutas y verduras duplica el riesgo de adquirir cáncer y afecciones cardíacas (11). Esta información propició que en la última década se incrementaran los estudios para identificar antimutágenos con el fin de conocer su potencia, toxicidad y mecanismo de

acción, como base para colocarlos en programas preclínicos y clínicos de quimioprevención. Para ubicar la importancia de este enfoque conviene señalar que en los últimos años se han hecho reuniones internacionales para evaluar los alcances de esta estrategia, en las que, como conclusiones generales se ha determinado que la efectividad antígenotóxica varía desde poca hasta muy alta, que estos agentes pueden ser de fácil acceso para el hombre, que su acción se presenta principalmente contra mutágenos específicos y que la forma en que actúan es variable, incluyendo procesos extracelulares e intracelulares, que van desde impedir la formación del mutágeno (en los premutágenos), hasta participar en la reparación del ADN o en la eliminación de la transformación maligna. También se ha señalado que existen serios problemas, por ejemplo, la dificultad para encontrar antimutágenos que actúen contra una amplia gama de mutágenos, la posibilidad de que el efecto se revierta al modificar las dosis y condiciones experimentales y las numerosas interacciones químicas que se pueden producir en un organismo tan complejo como el hombre, tanto para el mutágeno como para el inhibidor (12, 13).

En general los antimutágenos pueden inactivar al mutágeno al unírsele (desmutágeno) o suprimir su acción una vez que actúa sobre el DNA (bioantimutágeno).

Las sustancias antimutagénicas pueden actuar de diversas maneras, algunas se mencionan a continuación (14):

- Inhibidores en sitios extracelulares (desmutágenos).
- Inhibidores de la incorporación de los mutágenos y sus precursores.
- Inhibidores de la formación endógena del mutágeno.
- Inactivación del mutágeno por reacciones físicas o químicas.
- Inhibidores que actúan a nivel intracelular.
- Moduladores del metabolismo
 - a) inhibidores de la activación de promutágenos y
 - b) inductores de detoxificación.

- Bloqueadores de moléculas reactivas.
- Moduladores de la replicación y de la reparación (bioantimutágenos).
- Inhibidores del inicio de la transformación hacia células neoplásicas.

1.5. SISTEMAS DE PRUEBAS PARA IDENTIFICAR LESIONES GENOTÓXICAS

La Environmental Protection Agency (EPA) propone tres categorías en la selección de sistemas de evaluación de la genotoxicidad, las que se enumeran a continuación (15):

1.5.1. PARA DETECTAR MUTACIONES GÉNICAS:

- a) Bacterias.
- b) Levaduras.
- c) Insectos.
- d) Células somáticas de mamíferos en cultivo.
- e) Prueba del locus específico de ratón.

1.5.2. PARA DETECTAR ABERRACIONES CROMOSÓMICAS:

- a) Pruebas citogenéticas *in vivo* en mamíferos.
- b) Pruebas en insectos para detectar efectos cromosómicos hereditarios.
- c) Ensayo del dominante letal en roedores.

1.5.3. PARA DETECTAR DAÑO PRIMARIO AL DNA.

- a) Reparación del DNA en bacterias.
- b) Síntesis de reparación de DNA no programada en células de mamífero.
- c) Intercambio de cromátidas hermanas.
- d) Micronúcleos

1.5.3.1. INTERCAMBIO DE CROMÁTIDAS HERMANAS.

Uno de los métodos utilizados es la prueba de intercambio de cromátidas hermanas (ICH), la cual es selectiva de una de las fases de la mitosis. Esta es una prueba que detecta el intercambio de segmentos de sitios de ubicación homólogos entre las cromátidas que forman un cromosoma y que no resulta en una alteración morfológica del mismo (16). Desde el punto de vista molecular, éstos consisten en el intercambio de doble banda entre las moléculas del DNA de las cromátidas hermanas. Debe

enfatzarse que esta prueba se puede realizar aún cuando el segmento dañado sea muy pequeño. Para desarrollarla el material genético se incuba en presencia de bromodesoxiuridina (BrdU), la cual es incorporada al DNA de los cromosomas en el momento de su replicación.

El tipo y número de ICH se analiza en los cromosomas de segunda división en metafase por medio de microscopia de luz con tinción diferencial (17). El incremento en la frecuencia de aparición de los ICH de primera división indica que hay lesiones persistentes que probablemente no son reparables y que son capaces de producir ICH en dos ciclos de división subsiguiente. Si se analizan cuatro ciclos celulares consecutivos y aparecen los ICH, es posible que este fenómeno sea la expresión de un proceso de reparación deficiente de las lesiones inducidas en el DNA. También es factible sea la consecuencia de un proceso que permita a la célula dividirse, aún en presencia de lesiones en su DNA. De ser así el proceso puede ingerir la formación de mutaciones y su correlación con la formación de células cancerosas, ya que las lesiones persisten por más de cuatro ciclos celulares (18).

En humanos se estima una frecuencia de 1 a 3 intercambios por metafase, la cual puede incrementarse en forma significativa en individuos expuestos a algún agente genotóxico. La frecuencia se registra por célula y por cromosoma, pudiéndose identificar sencillos, dobles y triples (figura 3) (19).



Figura 3: Intercambio de Cromátidas Hermanas.

1.5.3.2. MICRONÚCLEOS

Los micronúcleos (MN) son corpúsculos intracitoplasmáticos de cromatina, separados del núcleo principal que se forman a partir de la ruptura de fragmentos cromosómicos acéntricos, o bien derivan de aquellos cromosomas que sufren un rezago anafásico, lo que se traduce en la aparición de una pequeña condensación de material cromosómico en células anucleadas como los eritrocitos, o también en el citoplasma de células nucleadas como los linfocitos o las espermatogonias (figura 4) (20). Evans y col. (1959) fueron los primeros en cuantificar los MN como método para la identificación de daño citogenético inducido con rayos gamma en presencia y ausencia de oxígeno. Estos autores observaron un incremento del 60% en la formación de fragmentos de cromosomas acéntricos en la mitosis. Estos fragmentos son excluidos del núcleo y se ubican en el citoplasma de células hijas (21). La frecuencia de aparición de eritrocitos policromáticos micronucleados realizado en médula ósea de ratón (EPCMN) es también un indicador de daño citogenético (22), en base a este trabajo fue posible el desarrollo de una prueba simple *in vivo*, en donde la identificación de EPCMN, nos permite evaluar el daño citogenético, esta prueba es ampliamente usada y referida como “Prueba de Micronúcleos” (23).

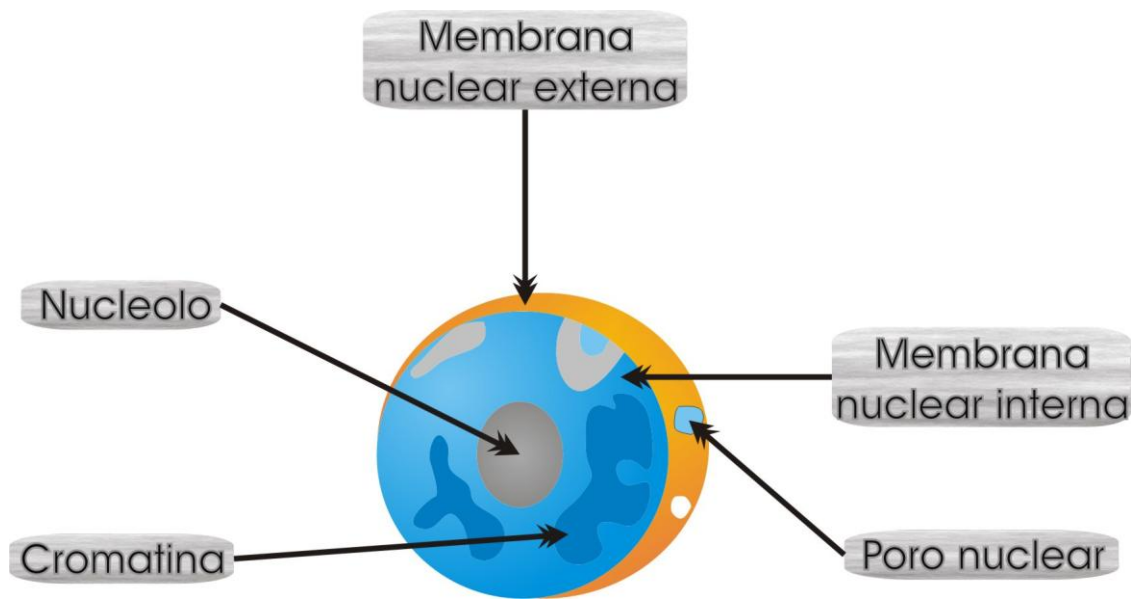


Figura 4. Célula

6. DOXORRUBICINA

La doxorubicina (DX) (Fig 5) es un antineoplásico clasificado dentro de los antibióticos de la antracilina. Es efectivo para casos de leucemia aguda, linfomas malignos y tumores sólidos, como el cáncer de mama. Este compuesto posee la capacidad de intercalarse con el DNA y alterar su funcionalidad. Produce rupturas simples y dobles en la cadena del DNA así como intercambio de cromátidas hermanas, entre otros daños. La escisión del DNA parece estar mediada por la acción de la topoisomerasa II (24). Al respecto las antraciclina reaccionan con la citocromo P450 reductasa, en presencia del fosfato de la NADPH para formar radicales semiquinona intermediarios, que a su vez pueden reaccionar con oxígeno para producir radicales aniónicos superóxido y generar peróxido de hidrogeno y radicales hidróxido (OH), que son altamente nocivos para las células. La producción de radicales libres está estimulada en forma significativa por la interacción de la DX con el hierro. Además, las reacciones intramoleculares de transferencia de electrones por los intermediarios semiquinonas

dan lugar a la producción de otros radicales y por lo tanto a potentes agentes alquilantes (25). Las antraciclina también pueden interactuar con las membranas celulares y alterar sus funciones; entre las que destaca la DX y se administra en general por vía intravenosa y es rápidamente captada por el corazón, riñones, pulmones y bazo. No atraviesa la barrera hematoencefálica y se elimina por conversión metabólica en una variedad de productos menos activos o inactivos, como doxorubicinol, y agluconas (25).

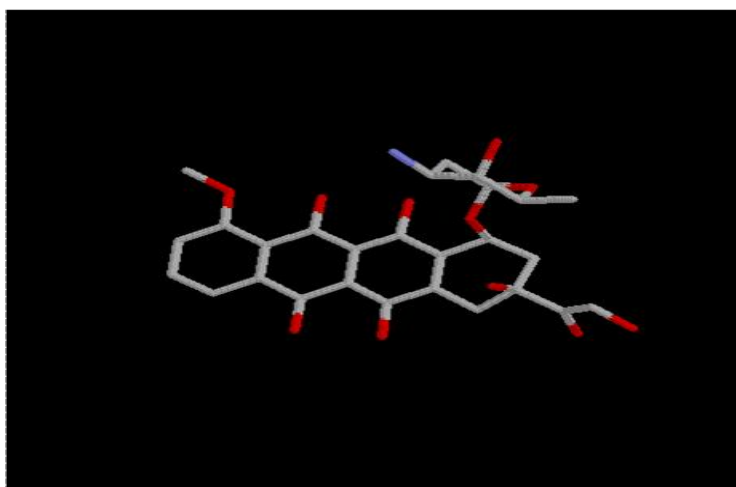


Figura 5. Doxorubicina

1.7. RADICALES LIBRES

El término se aplica a especies químicas independientes con uno o más electrones desapareados. Esta situación es energéticamente inestable, de tal forma que son altamente reactivos; y solo logran su estabilidad energética mediante la remoción de electrones y por lo tanto la oxidación de moléculas localizadas en el medio (26). Existen diferentes tipos de radicales libres (RL); los que tienen uniones covalentes se denominan compuestos electrofílicos y forman aductos en glutatión, proteínas, lípidos, carbohidratos y ácidos nucleicos, como en el caso de la DX. Otro tipo de interacciones con estas sustancias endógenas es la no covalente, unión que se realiza por las diferentes especies reactivas de oxígeno (ERO), que pueden desencadenar reacciones secuenciales de tipo redox, que inducen oxidación de lípidos, proteínas y ácidos nucleicos (27).

1.8. ANTIOXIDANTES

En condiciones fisiológicas, los RL generados son detoxificados a través de mecanismos antioxidantes, de tal forma que existe un equilibrio entre fenómenos prooxidantes y antioxidantes. Los antioxidantes se obtienen por el consumo de frutas y verduras, sin embargo, bajo ciertas circunstancias este equilibrio se altera; por ejemplo el exceso en la producción de Especies Reactivas del Oxígeno (EROs), esta situación se denomina estrés oxidativo, lo que se define como una situación en la que existe tanto un aumento en la velocidad de generación de especies reactivas del oxígeno como una disminución de los sistemas de defensa, lo que resulta en una mayor concentración, en estado estacionario, de EROs. Es en esta situación de estrés oxidativo en la que se manifiestan las lesiones que producen los radicales libres. Estos reaccionan químicamente con lípidos, proteínas, carbohidratos y ADN al interior de las células, y con componentes de la matriz extracelular, por lo que pueden desencadenar un daño irreversible que, si es muy extenso, puede llevar a la muerte celular (fig. 6) (28). Los antioxidantes sintetizados en el organismo los constituyen las enzimas y proteínas unidas a metales, como la superóxido dismutasa, la catalasa, la glutatión eroxidada y las enzimas de reparación del ADN. Algunos antioxidantes que se han identificado son las vitaminas A, C, D y E, el selenio, compuestos polifenólicos, flavonoides, esteroides y terpenos (29).



Figura 6. Estrés oxidativo y daño celular al ADN

1.9. INMUNOGENÉTICA Y SU RELACIÓN CON LA PROTECCIÓN CELULAR

El conocimiento inmunológico es especialmente necesario en el campo de la terapéutica de tumores, particularmente en el uso equilibrado de la cirugía y la radioterapia. Además, el conocimiento inmunitario en otras especialidades ha permitido entender con más precisión los mecanismos mediante los cuales un solo agente etiológico puede producir un amplia gama de manifestaciones clínicas diferentes. Un complejo sintomático completamente diferente, causado por complejos inmunitarios solubles que reaccionan con el complemento en forma de cascada, se encuentran en aquellas reacciones en las que interviene la de los linfocitos específicamente sensibilizados con el antígeno como parte de una reacción mediadas por células o de hipersensibilidad retardada. La respuesta inmunitaria, una vez producida “recuerda” al antígeno, y en las futuras “exposiciones” o encuentros con él puede surgir la reacción, pero con mayor intensidad. Esta “memoria” inmunológica varía con el tipo y lapso de la exposición y la reacción desencadenada. La respuesta inmunitaria es función del sistema linfoarticular, conocido también como sistema inmunitario. En el ser humano la respuesta inmunitaria está compuesta de dos mecanismos principales inmunidad mediada por células (celular), e inmunidad

mediada por anticuerpos (humoral) (Fig. 7) (30). Ambas respuestas poseen un alto nivel de especificidad orientada a epítomos antigénicos expresados en componentes moleculares de agentes infecciosos, células heterólogas (de trasplante) o transformadas (cancerosas), incluso células autólogas (autoinmunidad). Se acepta que las dos son mediadas por sistemas celulares independientes, y a pesar de que tienen identidad separada, en muchas formas son interdependientes. Los anticuerpos son globulinas específicas que forman un complejo con el antígeno que desencadenó su producción, son sintetizados básicamente por las células plasmáticas derivadas de los linfocitos B en los ganglios linfáticos y se clasifican en inmunoglobulinas (Igs). También se les llama globulinas gamma. Existen cinco principales Igs y cada una de ellas, media una respuesta inmunitaria, de manera diferente (31).

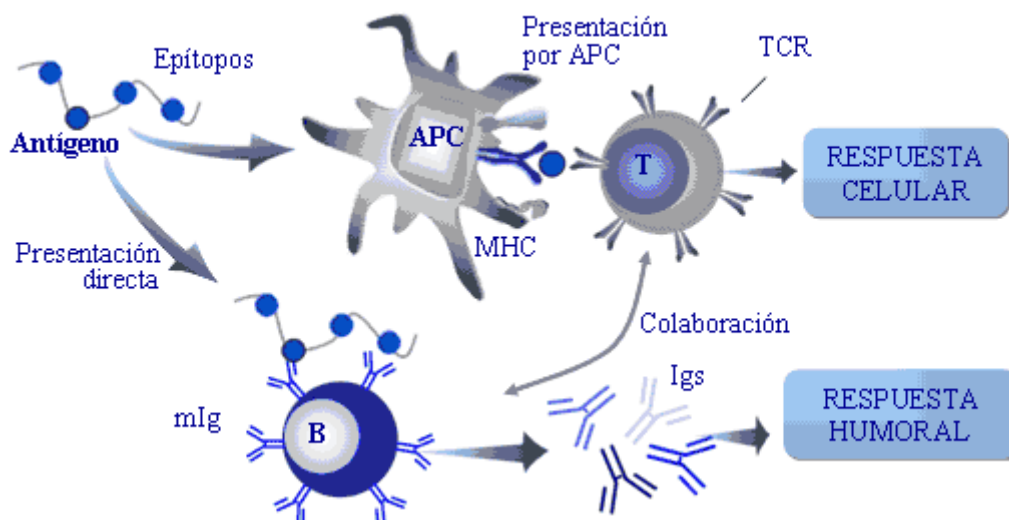


Figura 7. Respuesta celular y humoral a antígenos.

1.10. LINFOCITOS:

Los linfocitos son células de alta jerarquía en el sistema inmune, principalmente encargadas de la inmunidad específica o adquirida. Con el nombre de linfocitos se engloban diferentes tipos de células linfoides, que encierran diferencias estructurales y funcionales aún no bien esclarecidas. Las funciones del sistema linfático son en

general la producción de anticuerpos circulantes y la expresión de la inmunidad celular, refiriéndose esto último al autorreconocimiento inmune, hipersensibilidad retardada, rechazo de los injertos y reacciones injerto contra huésped (32).

Dos tipos funcionalmente diferentes de linfocitos han sido descritos: los linfocitos T o timo-dependientes y los linfocitos B o médula ósea dependientes. Aproximadamente el 70 a 80% de los linfocitos en sangre periférica muestran características de células T. Estos tienen una vida media de varios años, así como una gran capacidad y velocidad para recircular entre la sangre y los tejidos. También almacenan y conservan la "memoria inmunológica" (células T de memoria). Además, una vez activadas, son las células efectoras o ejecutoras (células asesinas) de la inmunidad celular y secretan sustancias biológicamente activas (linfoquinas) que sirven de mediadores solubles de inmunidad en la respuesta inflamatoria (33).

Los Linfocitos B son un tipo celular que cumple múltiples funciones en el mantenimiento de la inmunidad, se originan y maduran en medula ósea pero una vez que han completado estos cambios se ubican en los ganglios linfáticos, donde se activan en presencia de un agente extraño, con la ayuda de otro tipo celular, los Linfocitos T CD4 + o Linfocitos T ayudadores; aunque bajo ciertas circunstancias pueden hacerlo en ausencia de estos. Las células B durante su maduración expresan diferentes moléculas de superficie que son útiles para su identificación y conocimiento de su capacidad funcional. Estas células se localizan fundamentalmente en los órganos linfoides. Tienen receptores para antígenos específicos y, por tanto, pueden reconocer y responder al que se les presente (figura 8) (34).

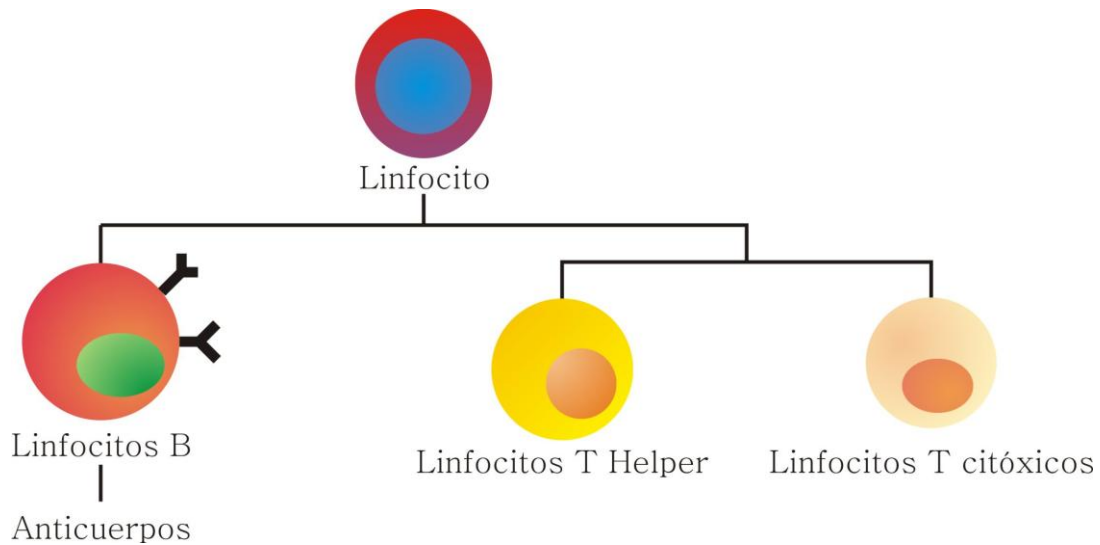


Figura 8. Linfocitos B y Linfocitos T

En general, los linfocitos se encargan de la producción de anticuerpos y de la destrucción de células anormales. Estas respuestas ocurren en el interior de los órganos linfoides, los cuales, para tal propósito, deben suministrar un entorno que permita la interacción eficiente entre linfocitos, macrófagos y antígeno.

1.11. MEDICINA TRADICIONAL Y *Uncaria tomentosa*

En el territorio de Ibero-América se asientan prácticamente todos los tipos de vegetación conocidos, lo que ha sido aprovechado por la medicina tradicional para utilizar numerosas especies con actividad curativa. Originalmente casi todos los medicamentos fueron preparados por trituración y mezcla de partes de plantas; tallo, albura, corteza, raíces, semillas son algunos ejemplos. Si el producto se emplea sin mucho refinamiento, como las hojas molidas o la savia pulverizada seca, recibe el nombre de fármaco en bruto. En esta forma contiene muchos materiales extraños sin carácter medicinal, y a pesar de que este material es inerte en su mayor parte puede irritar a los tejidos (35, 36). En este tipo de fármacos hay sustancias conocidas como principios activos de los que depende su actividad básica, los cuales varían en naturaleza y efecto, dentro de los que se encuentran los alcaloides que son sustancias

orgánicas que reaccionan con un ácido para formar una sal, y los glucósidos que son principios activos que al descomponerse forman azúcares con una glicona (37).

En años recientes se ha conceptualizado a los medicamentos en función de fórmulas químicas orientadas a enfermedades o funciones corporales específicas. A los agentes seleccionados se les mide su pureza, se realizan estudios en animales para medir su eficacia y falta de toxicidad y después se someten a ensayos clínicos en seres humanos (38). Dentro de los vegetales se encuentra una planta conocida comúnmente como “uña de gato, saventario, matapulgas, o chivito” y pertenece a la familia de las *rubiáceas* con el nombre de *Uncaria tomentosa* (UT) y a pesar de que se le han atribuido muchas propiedades curativas, existen pocos estudios científicos al respecto. La UT es una planta originaria de Perú de la cual se utiliza en la actualidad con mucha frecuencia el polvo de la semilla y el extracto de la corteza o raíz, y aunque se han aislado algunos de sus componentes principales como pteropodina (PT) y beta-sitosterol (BS), no existen estudios que expliquen el mecanismo de acción de estas sustancias o que se refieran de una manera más concreta a sus efectos en el ser humano, ya sean benéficos o dañinos, esta planta ha sido utilizada desde hace medio milenio por los indios de Perú, como tratamiento para diversos padecimientos y actualmente se utiliza en diversas partes mundo por sus propiedades curativas en medicina tradicional, principalmente para el tratamiento de cáncer, bursitis, gastritis, enfermedades reumáticas, artritis, diversas dermatopatías, enfermedades del sistema respiratorio y como inmunoestimulante. En México la planta crece a orilla de los ríos en algunos estados como Chiapas, Guerrero y el Estado de México, y la cultivan como planta de ornato en algunas poblaciones, siendo las características taxonómicas similares a la que se cultiva en Perú. En 1975 Phillipson y Hemminway, aislaron algunos de sus componentes por espectroscopia y cromatografía identificaron la presencia de oxindoles (39, 40). En 1976 Matta y col. identificaron a 5 compuestos conocidos como pteropodina, especiofilina, isopteropodina, uncarina F e isomitrafalina,

todos pertenecientes al grupo de alcaloides oxindólicos, además la epicatequina y cuatro procianidinas diméricas se encontraron como constituyentes de la fracción polifenólica del extracto de la planta. (41). En 1988, Chapuis y col. demostraron que 260 extractos de UT no fueron citotóxicos (42). En 1989, Senatore demostró la presencia de beta-sitosterol (60%), estigmasterol y campesterol en UT (43). En forma paralela a estos estudios se desarrolló la teoría que consideraba a la carcinogénesis etiológicamente relacionada con la mutagénesis, y por otro lado, surgieron datos referentes a que los tumores malignos eran originados por mutágenos ambientales. Conceptos que hicieron que se desarrollara la línea de investigación sobre la prevención química del cáncer. Al respecto la UT ha resultado útil, se descubrió que inhibía la capacidad mutagénica utilizando fotomutagénesis con metoxaleno en *Salmonella Typhimurium* (44). Hacia 1990 Lemaire y Col. iniciaron investigaciones en células de organismos superiores, en células humanas y en macrófagos de ratas donde se observó que UT estimula la producción interleucina 1 y 6 (45). Por otra parte Sheng y col. comprobaron que tiene efecto apoptótico e inhibe la proliferación de células tumorales (46).

En el tratamiento del cáncer cervicouterino se ha observado que disminuye el número de sitios específicos receptores de estrógenos y en el estómago ha tenido acción antiinflamatoria (47), hasta la fecha sin embargo no existen estudios en mamíferos *in vivo*, para evaluar la genotoxicidad y/o antigenotoxicidad relacionadas con la planta.

1.12. OXINDOLES PENTACÍCLICOS

Los oxindoles son compuestos nitrogenados que se encuentran en algunos vegetales crucíferos. Estudios experimentales demuestran que estas sustancias tienen un efecto protector contra los cánceres de las glándulas mamarias, del colon y de otros órganos (48). En *Uncaria tomentosa* se han aislado alcaloides oxindólicos, los cuales han demostrado efecto citostático, además de un efecto inmunoestimulante y antiinflamatorio (49). Asimismo se comprobó que aumentan la actividad fagocítica de

los granulocitos (50). Recientemente se encontró que los alcaloides pentacíclicos de la UT inducen a las células endoteliales humanas a liberar el factor de regulación de la proliferación linfocítica (51). Se demostró que la base antitumoral de la UT está en la presencia de una serie de alcaloides de tipo oxindólico, entre los que destaca la pteropodina, o uncarina C (fig. 9).

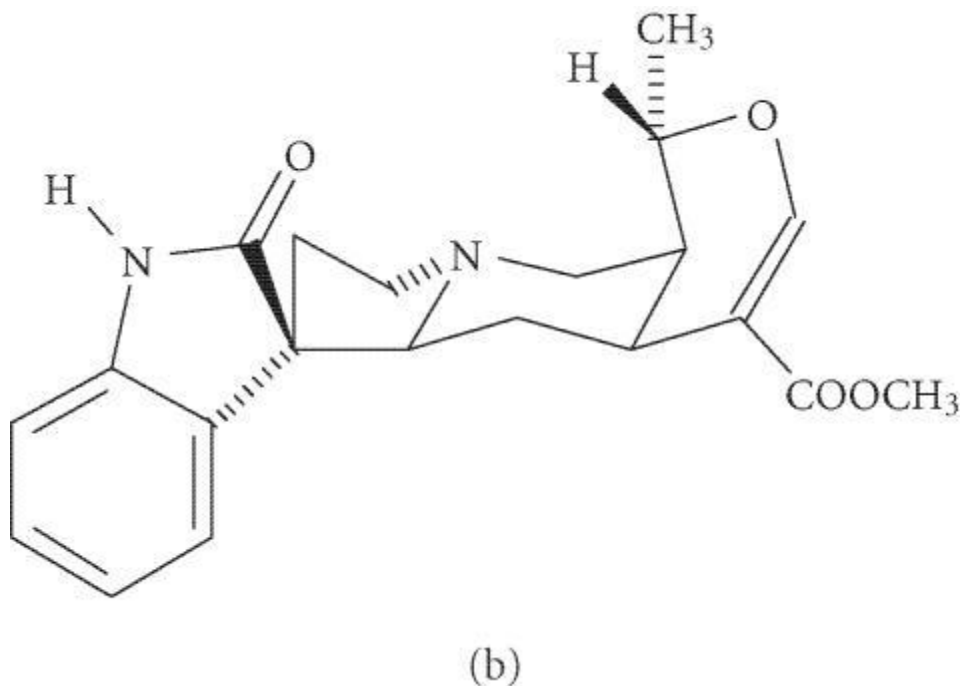


Figura 9. Estructura química de pteropodina

1.13. ESTEROLES

Los esteroides son compuestos derivados de plantas y en general, todos los alimentos de origen vegetal contienen cierta cantidad de esteroides. En el régimen alimenticio occidental, las principales fuentes de esteroides son los aceites vegetales y los productos industrializados, como las margarinas (52). Se ha identificado un mínimo de 44 esteroides siendo más frecuentes el beta-sitosterol, campesterol y estigmasterol. La estructura química de estos compuestos se diferencia con la del colesterol por la presencia de un metilo o un grupo de etilo adicional y doble enlace. Los esteroides han sido bien tolerados en numerosos ensayos clínicos que se realizaron en más de 1800 personas con dosis de hasta 25 g por día. Los estudios han establecido que por lo

menos 1 gramo de esteroles en forma de éster puede originar una reducción estadísticamente significativa del colesterol (48, 53). Algunas investigaciones han revelado que los esteroles bloquean el desarrollo de tumores en el colon, de glándulas mamarias y de próstata (54). Los mecanismos por los cuales ocurre no están claramente establecidos, pero se conoce que alteran los mecanismos de transferencia a través de la membrana celular durante el crecimiento de tumores y reducen la inflamación (55). Además, se les atribuye un efecto antioxidante que se debe principalmente a la presencia de tocoferoles naturales, siendo significativa la presencia de delta-tocoferol, que es el isómero de mayor actividad, este efecto es potenciado por los fitosteroles naturales como beta-sitosterol, campesterol y estigmasterol (fig. 10) (56).

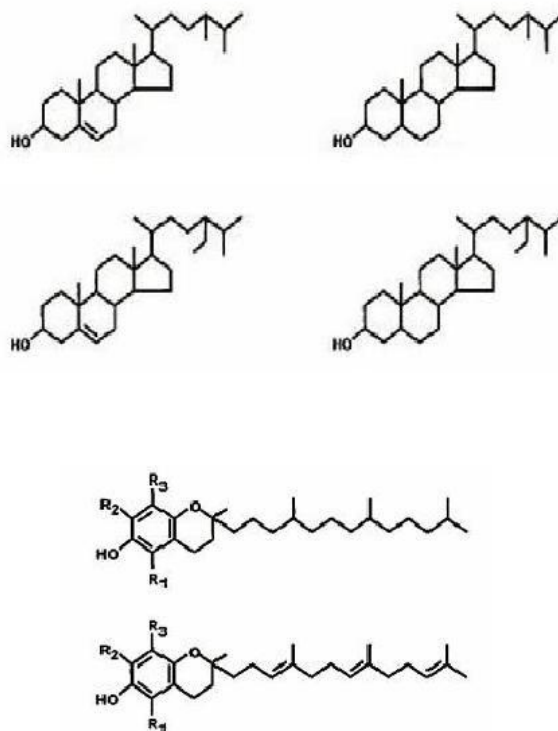


Figura 10. Esteroles

1.14. BETA-SITOSTEROL

Es un fitosterol con estructura similar a la del colesterol de la grasa animal, se diferencia por la presencia de un grupo etil en la cadena lateral (fig. 2). Todas las plantas, incluyendo las frutas, verduras, granos, especias y semillas poseen este compuesto. Los aceites de plantas son una fuente particularmente rica en beta-sitosterol, el cual se utiliza en el tratamiento de hipercolesterolemia, así como para modular la función inmune, la inflamación e interviene en el control de la producción de citocinas. La investigación también ha demostrado que el beta-sitosterol ayuda a normalizar la función de linfocitos del T-cooperadores y células supresoras (fig. 11) (57, 58).

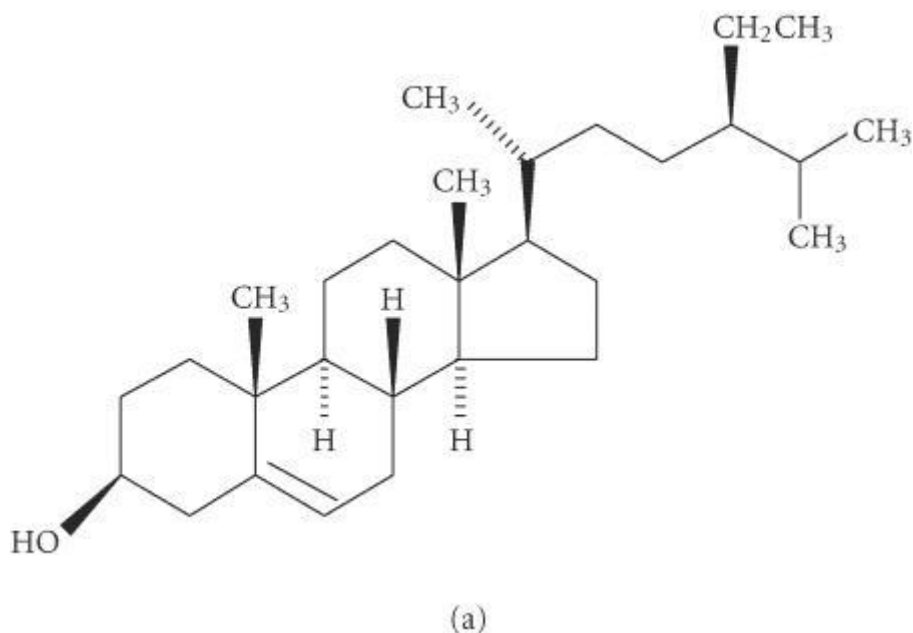


Figura 11. Estructura química de beta-sitosterol

2. JUSTIFICACIÓN

La UT es una planta que utiliza el hombre para el tratamiento de diversos problemas de salud, que incluyen afecciones de tipo inflamatorio y el cáncer. Además, algunos estudios con extractos de la planta han mostrado efectos antitumorales. Dos de sus componentes son la pteropodina y el beta-sitosterol, agentes que han mostrado

algunas propiedades biomédicas que sugieren su participación en las propiedades curativas de UT y por lo tanto, la conveniencia de estudiarlos en forma específica. En particular, es indispensable determinar su capacidad para inhibir el daño producido al DNA para considerarlos como candidatos para la quimiopreención del cáncer, ya que, en general, esta afección se caracteriza por alteraciones en el material genético. Por otra parte, el presente estudio antígenotóxico es el primero que se efectúa in vivo con los compuestos seleccionados y que evaluará si dicha acción se relaciona con la capacidad de los compuestos como atrapadores de radicales libres, efecto que se pondría de manifiesto al actuar contra el mutágeno seleccionado, la Doxorubicina, así como por los resultados con el ensayo de DPPH. El proyecto por lo tanto, también nos ayudará a estudiar un probable mecanismo de acción de los compuestos y abrirá una nueva línea de investigación sobre las bases científicas que expliquen las propiedades biomédicas de BS y PT.

3. HIPÓTESIS

Si el extracto de *Uncaria tomentosa* ha presentado efecto antígenotóxico, antioxidante e inmunoestimulante in vitro, es posible que sus componentes mayoritarios pteropodina y beta-sitosterol tengan propiedades similares in vivo

4. OBJETIVOS

4.1. OBJETIVO GENERAL

Evaluar el potencial antígenotóxico, antioxidante e inmunoestimulante de la pteropodina y el beta-sitosterol.

4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Evaluar la capacidad de los compuestos para reducir la frecuencia de intercambio de cromátidas hermanas inducidas por la doxorubicina en ratón.
- b) Determinar el efecto de los compuestos sobre probables cambios provocados por la doxorubicina en la cinética de proliferación celular y el índice mitótico en ratón
- c) Evaluar la capacidad de los compuestos para reducir la frecuencia de EPMN inducidos por la doxorubicina en ratón .
- d) Investigar el potencial de pteropodina y beta-sitosterol para atrapar radicales libres vitro
- e) Estudiar el efecto de pteropodina y beta-sitosterol como inductores de la proliferación de linfocitos de ratón

5. MATERIAL

5.1. Material

5.1.1. Material biológico: Ratones de la cepa CD1 con un peso promedio de 25 g

5.1.2. Material de laboratorio y equipo:

Bata, cubrebocas y guantes desechables, jeringas, material de vidrio necesario para realizar el ensayo, tableteadora, equipo de disección, engrapadora quirúrgica, microscopio óptico, centrífugas, vortex, gasas estériles, algodón, estufa, potenciómetro.

5.1.3. Soluciones y colorantes:

Solución de KCl 0.075 M, solución reguladora de fosfato-citrato: 14.19 g de fosfato disódico heptahidratado diluido en 1000 ml de agua destilada, adicionando ácido cítrico (5.25 g/50 ml), hasta obtener un pH de 7.0.

Solución salina citrato: 17.53 g de cloruro de sodio y 8.82 g de citrato de sodio se disolvieron en 1 000 ml de agua destilada.

Solución reguladora de fosfatos: * Solución A: Fosfato de potasio monobásico 0.3 M., *Solución B: Fosfato de sodio dibásico 0.3 M., +Se mezclaron 3 partes de solución A con 2 partes de la solución B. Colorante Hoescht (100 µg/ml), protegida de la luz.

Colorante Giemsa: 5 ml de solución de fosfatos (A+B) y 2 ml de colorante Giemsa en 43 ml de agua destilada.

6. METODOLOGÍA

El trabajo se efectuó en ratones machos de la cepa CD1, con un peso promedio de 25 g. Para cada compuesto se hicieron cuatro determinaciones: la dosis letal media, la genotoxicidad y citotoxicidad, la antigenotoxicidad de pteropodina y beta-sitosterol en presencia de doxorubicina y el recuento de linfocitos totales en frotis sanguíneo. Asimismo se evaluó el efecto antioxidante de ambos compuestos mediante la técnica con el radical DPPH. Los animales se colocaron en jaulas metálicas con ciclos de 12

horas de luz-oscuridad en grupos de 5 individuos y con libre acceso al agua y alimento (purina). La vía de administración fue intraperitoneal (IP).

6.1. DETERMINACIÓN DE LA DOSIS LETAL CINCUENTA (DL₅₀) DE PTEROPODINA Y BETA-SITOSTEROL.

Para cada compuesto se seleccionaron previamente al azar 9 animales los cuales se dividieron en tres lotes con 3 ratones cada uno y se les administró por vía intraperitoneal (IP) las dosis de 10, 100 y 1000 mg/Kg. del compuesto (PT o BS) al lote correspondiente, cuantificando la mortalidad con cada una de las dosis. Los animales se mantuvieron en observación durante 14 días, se contabilizaron el número de animales muertos y se mantuvo en observación a los animales vivos. Al término de ese periodo y siguiendo la metodología descrita por Lorke (1983) (59) se consultaron las tablas de dosis de acuerdo con los resultados obtenidos, para determinar la dosis con la que se continuaría el estudio, las cuales fueron 4 dosis (150, 250, 350 y 450 mg/kg) el resultado de esta segunda etapa se utilizó para obtener la DL50 de cada una de las sustancias.

6.2. DISTRIBUCIÓN DE LOS GRUPOS EXPERIMENTALES

En la tabla 1 y 2 se indican los tratamientos de cada grupo experimental en los ensayos realizados con pteropodina y beta-sitosterol (genotóxicos, antígenotóxico y recuento total de linfocitos). Cada grupo se formó con 5 ratones y la vía de administración fue IP. En los grupos combinados, se administró doxorubicina y 30 minutos después las diferentes dosis de pteropodina o beta-sitosterol.

Tabla A: Pteropodina

Ensayo genotóxico	Ensayo antígeno tóxico	Recuento total de linfocitos
Agua destilada 0.45 ml	Agua destilada 0.45 ml	Agua destilada 0.45 ml
PT 100 mg/kg	PT 100 mg/kg + dox 10 mg/kg	PT 100 mg/kg
PT 200 mg/kg	PT 200 mg/kg + dox 10 mg/kg	PT 200 mg/kg
PT 300 mg/kg	PT 300 mg/kg + dox 10 mg/kg	PT 300 mg/kg
PT 600 mg/kg	PT 600 mg/kg + dox 10 mg/kg	PT 600 mg/kg
Dox 10 mg/kg	Dox 10 mg/kg	<i>Interferon alfa</i> 0.01 µl/kg

Tabla B: Beta-sitosterol

Ensayo genotóxico	Ensayo antígeno tóxico	Recuento total de linfocitos
Aceite mineral 0.45 ml	Aceite mineral 0.45 ml	Aceite mineral 0.45 ml
BS 100 mg/kg	BS 200 mg/kg + dox 10 mg/kg	BS 200 mg/kg
BS 200 mg/kg	BS 400 mg/kg + dox 10 mg/kg	BS 400 mg/kg
BS 300 mg/kg	BS 600 mg/kg + dox 10 mg/kg	BS 600 mg/kg
BS 600 mg/kg	BS 1000 mg/kg + dox 10 mg/kg	BS 1000 mg/kg
Dox 10 mg/kg	Dox 10 mg/kg	<i>Interferon alfa</i> 0.01 µl/kg

los procedimientos que se emplearon para identificar la genotoxicidad y antigenotoxicidad de la pteropodina y beta-sitosterol, fueron con las técnicas citogenéticas para ICH y MN que a continuación se describen:

6.3. TÉCNICA DE INTERCAMBIOS DE CROMÁTIDAS HERMANAS

6.3.1. Obtención de la médula ósea del ratón

Se prepararon tabletas de 45 mg de 5-bromodesoxiuridina (5BrdU), las cuales se recubrieron con parafina en un 60%, elaborándose una tableta para cada ratón.

Previa aplicación de anestesia por inhalación con éter, se procedió a realizar una pequeña incisión en la región abdominal del ratón, para implantar subcutáneamente una tableta de 5BrdU. Se consideró este momento como la hora cero del tratamiento (0 h). Después de 60 minutos y para el ensayo genotóxico se realizó la administración IP de las dosis de trabajo de PT doxorubicina y el vehículo (Tabla A) y las diferentes dosis de BS (Tabla B), para el ensayo antigenotóxico 30 minutos después de la aplicación de las dosis de tratamiento de PT y BS, se administró 10 mg/kg de doxorubicina a los mismos grupos por vía intraperitoneal (tabla A y B). Transcurridas 21 horas de implantada la tableta de 5BrdU se administró por vía IP 5 mg/Kg. de colchicina a cada ratón. Concluidas 23.45 horas, se procedió a sacrificar a los ratones por dislocación cervical, para inmediatamente extraerles la médula ósea de ambos fémures con una solución de KCl 0.075 molar, e incubar cada una de las muestras a 37 grados centígrados durante 30 minutos. Posteriormente se centrifugó la suspensión celular durante 15 minutos a 1,500 rpm; se retiró el líquido sobrenadante y se resuspendió el paquete celular, realizando la fijación con una solución de metanol:ácido acético (3:1). Se repitió la fijación 2 veces más. Posteriormente se procedió a la elaboración de laminillas en un portaobjetos húmedo, dejando caer a cierta distancia 1 o 2 gotas de la muestra y verificando la dispersión celular y cromosómica (60).

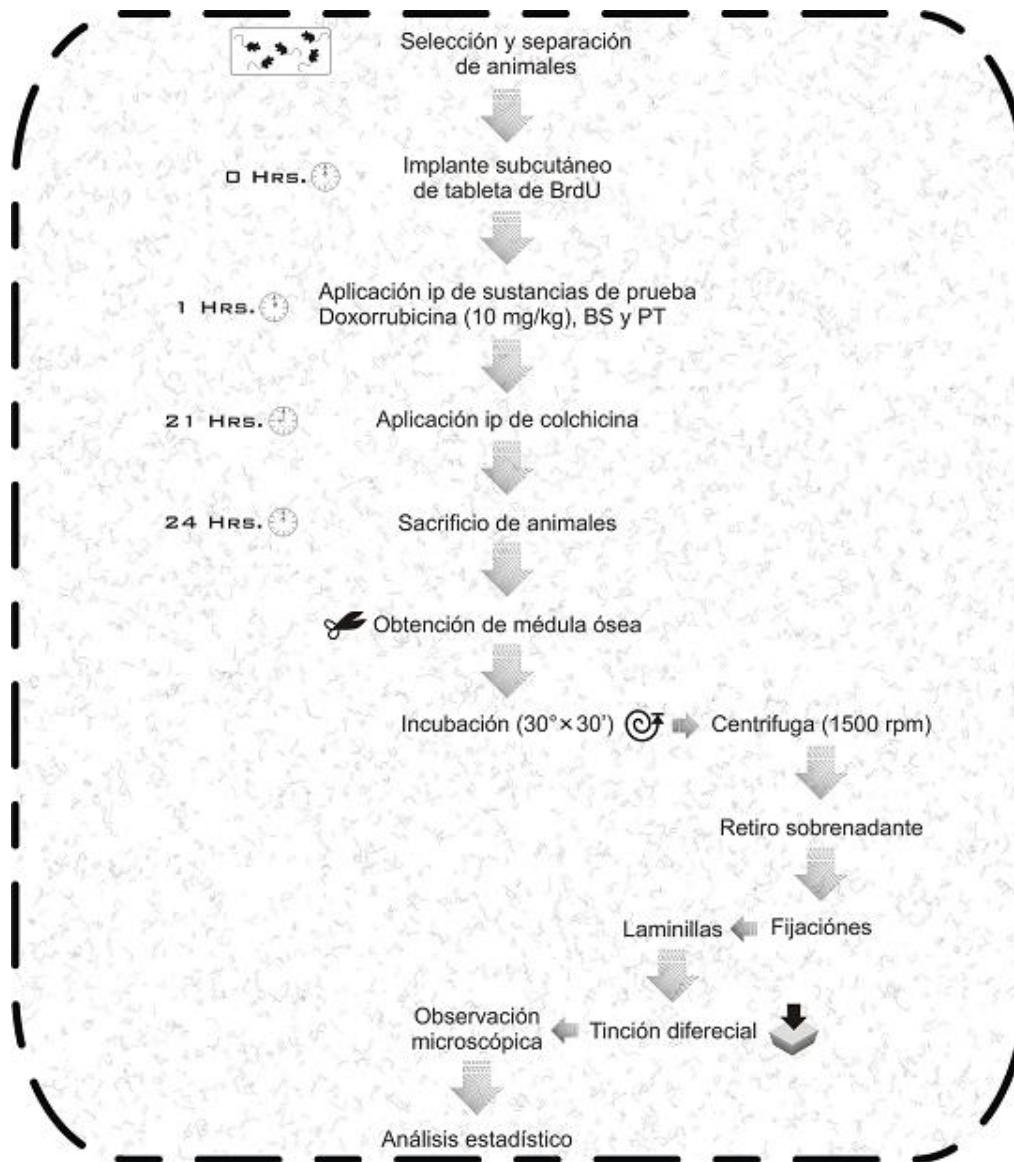


Figura 12. Esquema del desarrollo de la técnica de Intercambio de Cromátidas Hermanas

6.3.2. Tinción diferencial de las cromátidas

El primer paso consistió en una tinción con el colorante Hoescht 33258.

Las laminillas se colocaron en una solución de fosfato-citrato y se expusieron a luz negra. Las células se lavaron con una solución salina citrato. Finalmente se tiñeron con una solución Giemsa al 2% (60).

6.3.3. Observación microscópica (figura 13)

Para cada uno de los ratones en estudio se efectuó el siguiente análisis citogenético:

- Determinación de la frecuencia de ICH en 60 metafases de segunda división.

- Evaluación de la cinética de proliferación celular en 100 metafases, contabilizando el número de mitosis en primera, segunda y tercera división.
- Determinación del índice mitótico en 1000 células.



Figura 13. Cromosoma obtenido con la técnica de ICH

6.3.4. Análisis estadístico

Se usaron las pruebas de análisis de varianza (ANVA) unifactorial para comparar los diferentes grupos de tratamiento y los diferentes parámetros de evaluación. Posteriormente se utilizó la Xi cuadrada para evaluar la significancia estadística de la cinética de proliferación celular, así como la T de Student para comparar los diferentes grupos de tratamiento (61).

6.4. TÉCNICA DE MICRONÚCLEOS

Para el ensayo genotóxico se realizó la administración por vía intraperitoneal a cada ratón en los diferentes grupos las dosis de prueba de PT y BS, así como el vehículo en el grupo control negativo y la doxorubicina en el grupo control positivo. Para el estudio antígenotóxico 30 minutos después de la aplicación de las dosis de tratamiento, se administró 10 mg/kg de doxorubicina a los que se les administró PT o BS por vía intraperitoneal (figura 15). La recolección de muestras sanguíneas se realizó cada 24 hrs. desde 0 hasta las 96 horas, a través de un corte de 1 mm de la cola de los ratones y se realizaron frotis sanguíneos, que para su fijación se colocaron

durante 5 minutos en vasos Koplín conteniendo metanol, posteriormente se tiñeron con el colorante Giemsa al 4% en amortiguador de fosfatos con pH 6.4 (62).

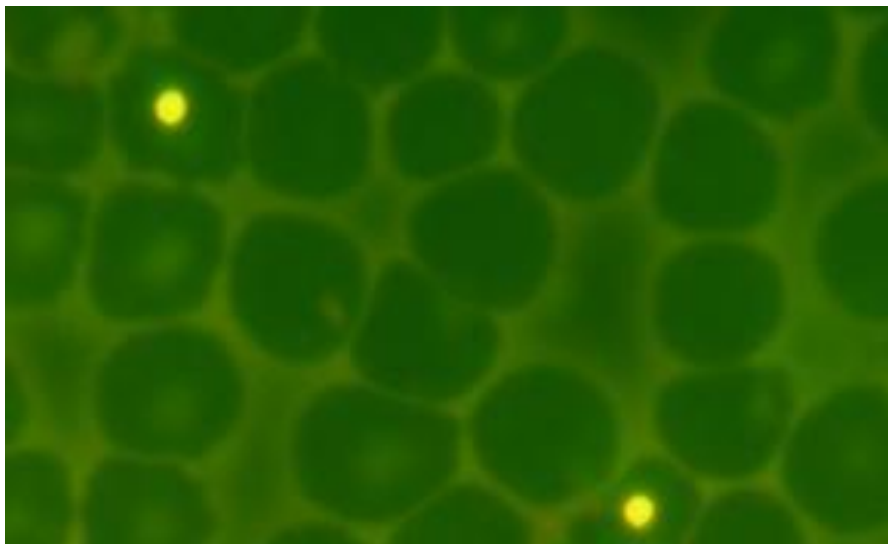


Figura 14: Eritrocito policromática observado en microscopio electrónico

Se realizó el análisis microscópico de los frotis (figura 14), utilizando el objetivo de inmersión para cuantificar el número de micronúcleos presentes en 1000 eritrocitos, utilizando la técnica de lectura escalonada en almenas que se utiliza ordinariamente en el recuento diferencial leucocitario, finalmente se realizó un análisis estadístico.

6.5. RECUESTO DIFERENCIAL DE LINFOCITOS

En este ensayo se realizó la administración de las 4 dosis de tratamiento con PT y BS por vía intraperitoneal, así como agua destilada en el grupo control negativo y se utilizó interferón alfa en el grupo control positivo. La recolección de muestras sanguíneas se realizó cada 24 hrs. hasta las 96 horas, a través de un corte de 1 mm de la cola de los ratones y se procedió de la siguiente manera (63):

1. La gota de sangre se colocó en el extremo de una lámina limpia.
2. Otra lámina de borde liso se coloca en ángulo de 45° sobre la gota dejando que la sangre se extienda sobre el borde más angosto e inclinado de ésta.

3. Luego se procede a deslizarla suavemente hacia el extremo opuesto tratando de arrastrar la gota en forma constante y uniforme dejando una película fina de sangre homogéneamente distribuida.
4. Una vez se logra adecuadamente este procedimiento se dejó secar.
5. Luego se colocó la preparación en un soporte y el cual se cubre con el colorante de Wright, dejándolo por espacio de 5 minutos.
6. Posteriormente se le añade agua en partes iguales hasta obtener un brillo metálico, dejando 6 minutos adicionales.
7. Finalmente se lavó con agua corriente y se dejó secar.

Finalizado la preparación de la lámina, se realizó un recuento diferencial de glóbulos blancos en 200 células, posteriormente con el número total de leucocitos por mm³ se obtiene el valor absoluto y tanto por ciento de cada tipo celular (figura 15).

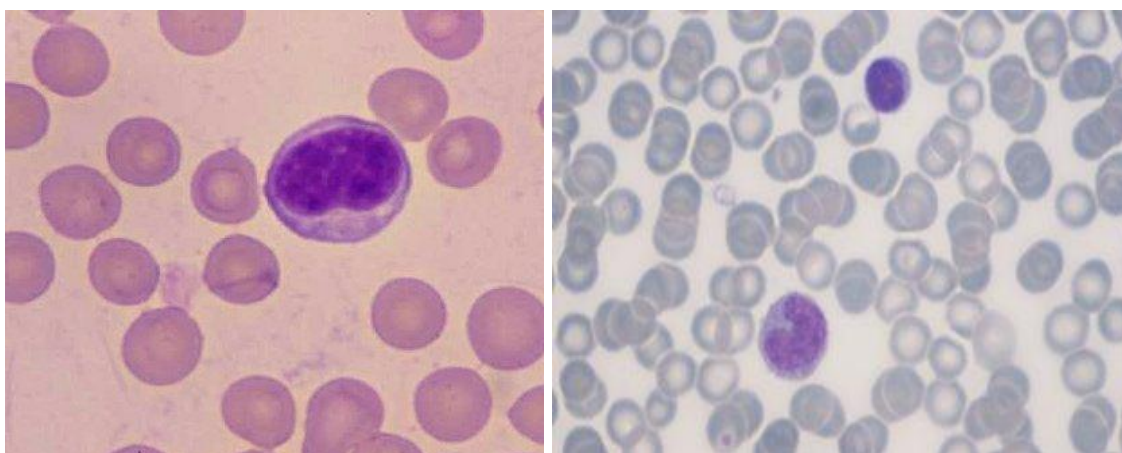


Figura 15: Linfocitos observados en frotis sanguíneo de ratón.

6.7. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE PTEROPODINA Y BETA-SITOSTEROL IN VITRO

La capacidad de PT y BS para capturar radicales libres se evaluó con la técnica que mide la pérdida de color del 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH), el cual es un radical libre estable y colorido, de tal manera que cuando un antioxidante captura al electrón del DPPH, el radical se desestabiliza y por lo tanto pierde color (64).

Se preparó una mezcla de reacción que contenía DPPH (86 $\mu\text{mol/L}$) y PT en diferentes concentraciones (0.02, 0.04, 0.06, 0.08 y 0.1 mM). Las muestras permanecieron en reposo 10 min a temperatura ambiente y las absorbencias se leyeron con una longitud de onda de 517 nm .

7. RESULTADOS

7.1. PTEROPODINA

7.1.1. EVALUACIÓN GENOTÓXICA

La DL50 para pteropodina fue de 771 mg/kg. Los resultados muestran que pteropodina no es inductor de ICH, observándose un comportamiento similar al testigo negativo con las cuatro dosis de prueba, cuyos valores se ubicaron entre de 1.08 ± 0.57 y 2.03 ± 0.27 (tabla 1) sin significancia estadística, el testigo positivo administrado con el antineoplásico doxorrubicina mostró un incremento significativo ($p < 0.05$) comparado con todos los grupos tratados, cuyo valor se ubico en 14.06 ± 0.68 (tabla 1). En la cinética de proliferación no se observó modificación del ciclo celular con las dosis probadas y el índice mitótico presentó datos citotóxicos únicamente con la dosis más alta de pteropodina pero sin significancia estadística (tabla 1).

Tabla 1. Frecuencia de ICH, cinética de proliferación e índice mitótico en médula ósea de ratones administrados con pteropodina.

Agente	Dosis (mg/kg)	ICH $X \pm d.e.$	Cinética			TPG $X \pm d. e.$	Índice mitótico $X \pm d. e$
			M1	M2	M3		
Vehículo	0**	2.51 ± 0.12	34	51	15	12.45 ± 0.23	5.94 ± 0.19
Pteropodina	100	1.15 ± 0.16	35	51	14	12.36 ± 0.14	5.97 ± 0.26
Pteropodina	200	2.03 ± 0.27	37	50	13	12.46 ± 0.21	5.80 ± 0.38
Pteropodina	300	1.08 ± 0.57	34	51	15	12.25 ± 0.33	6.70 ± 0.18
Pteropodina	600	1.44 ± 0.22	34	49	17	12.63 ± 0.16	7.13 ± 0.17
Doxorrubicina	10	$14.06 \pm 0.68^*$	39	50	11	12.47 ± 0.26	6.16 ± 0.68

*Diferencia estadísticamente significativa con respecto al testigo negativo ANOVA y t de Student, $p = < 0.05$. (TPG) Tiempo promedio de generación = $21 / [(1)(M1) + 2(M2) + 3(M3)] \times 100$, donde M1, M2 y M3 corresponde a la frecuencia de metafases de 1a, 2a y 3ª división respectivamente. **Corresponde a 0.45 ml del vehículo. La frecuencia de ICH se contabilizó en 300 metafases de 2ª división, la cinética de proliferación celular en 500 metafases y el índice mitótico en 5000 células por lote.

La frecuencia de MN en el grupo testigo negativo presentó un promedio de 1.35, y se incrementó significativamente ($p < 0.05$) al administrar doxorubicina en 22.0, sin embargo con pteropodina los MN se mantuvieron sin cambios con valores de 1.3 a 1.71 (tabla 2).

Tabla 2. Frecuencia de micronúcleos en ratones tratados con pteropodina y doxorubicina.

Agente	Dosis (mg/kg)	Frecuencia de micronúcleos			
		24 h	48 h	72 h	96 h
Vehículo	0**	1.4±0.31	1.35±0.46	1.3±0.33	1.45±0.17
Pteropodina	100	1.3±0.44	1.4±0.31	1.5±0.25	1.5±0.27
Pteropodina	200	1.4±0.26	1.5±0.16	1.6±0.13	1.61±0.51
Pteropodina	300	1.4±0.39	1.55±0.51	1.7±0.41	1.71±0.28
Pteropodina	600	1.5±0.19	1.64±0.31	1.6±0.32	1.65±0.36
Doxorrubicina	10	19.15±0.3*	21.72±0.17*	24.3±0.34*	22.82±0.17*

*Diferencia estadísticamente significativa con respecto al testigo negativo ANOVA y t de Student, $p < 0.05$. La frecuencia de micronúcleos se contabilizaron en 5000 células por lote

La frecuencia de eritrocitos policromáticos en la relación eritrocitos policromáticos/Eritrocitos normocrómicos (EPC/ENC) entre el grupo testigo negativo y los grupos con tratamiento no presentaron diferencia significativa y cuyos valores se ubicaron entre 14.9 y 22.9 (tabla 3), el testigo positivo presentó una disminución significativa en la relación de EPC/ENC con todos los grupos de tratamiento con valores promedio de 7.27 para pteropodina (tabla 3). Estos resultados sugieren que este compuesto no es genotóxicos con las dosis probadas lo que nos ofrece cierta seguridad para su uso, por lo que se procedió a evaluar el efecto antimutagénico de esta sustancia.

Tabla 3. Frecuencia de eritrocitos policromáticos en la relación EPC/ENC de ratones tratados con pteropodina y doxorubicina.

Agente	Dosis (mg/kg)	Frecuencia de E PC			
		24 h	48 h	72 h	96 h
Vehículo	0**				
Pteropodina	100	16.33 ± 0.38	19.66 ± 0.18	20.6 ± 0.19	21.8 ± 0.49
Pteropodina	200	14.9 ± 0.61	21.16 ± 0.37	20.36 ± 0.10	22.9 ± 0.35
Pteropodina	300	16.51 ± 0.32	21.5 ± 0.23	20.83 ± 0.08	20.8 ± 0.67
Pteropodina	600	17.62 ± 0.29	22.0 ± 0.55	19.86 ± 0.52	21.0 ± 0.47
Doxorrubicina	10	*5.33 ± 0.22	*8.1 ± 0.16	*9.6 ± 0.27	*8.06 ± 0.39

*Diferencia estadísticamente significativa con respecto al testigo negativo ANOVA y t de Student, $p < 0.05$. La frecuencia de micronúcleos se contabilizó en 5000 células por lote

7.1.2. EVALUACION ANTIGENÓTOXICA.

Los resultados de la prueba de ICH para determinar el efecto antigenotóxico de pteropodina contra doxorrubicina, se muestran en tabla 4, PT demostró actividad antimutagénica en las cuatro concentraciones probadas, al reducir las frecuencias de los ICH entre un 50 y 94% respecto al control positivo. La reducción más alta fue obtenida con la concentración de 600 mg/kg de PT y 10 mg/kg de doxorrubicina

Tabla 4. Intercambio de cromátidas hermanas (ICH), tiempo promedio de generación (TPG), e índice mitótico (IM) en médula ósea de ratón administrados con pteropodina (PT) y doxorrubicina (DR).

Agente	Dosis (mg/kg)	ICH	M1 M2 M3			TPG	IM
		X ± SD	%			X ± SD	X ± SD
Vehículo	***	2.51±0.12	34	51	15	12.45	5.94
DR	10	14.06±0.12*	39	50	11	12.47	6.16
PT/DR	100/10	3.56±0.18*	33	53	14	12.76	6.21
PT/DR	200/10	4.32±0.24*	38	52	10	12.89	6
PT/DR	300/10	4.53±0.42*	38	50	12	12.32	6.42
PT/DR	600/10	3.1±0.36*	36	53	11	12.37	5.96

M1, M2, and M3 = células de primera, segunda y tercera división. TPG = 21/(M1 + 2M2 + 3M3) (100)

*Diferencia estadísticamente significativa con respecto al testigo negativo ANOVA y t de Student, p = <0.05.

**Diferencia estadísticamente significativa con respecto al testigo positivo ANOVA y t de Student, p = <0.05.

***0.40 ml de agua inyectable

La frecuencia de micronúcleos se incrementó significativamente (p<0.05) al administrar doxorrubicina hasta 24.3±0.31, sin embargo estos valores disminuyeron al administrar pteropodina y doxorrubicina hasta valores cercanos al obtenido con el grupo control. Las reducciones más bajas ocurrieron a las 24 h de tratamiento (2.1 MN) por lo tanto, todos los índices de la reducción de las frecuencias de MN fueron 50% mayor que el grupo positivo.

I (tabla 5).

Tabla 5. Frecuencia de micronúcleos (MN) en ratones administrados con pteropodina (PT) y doxorubicina (DR)

Agente	Dosis Mg/kg	MN X ± DE.			
		24	48	72	96 h
Vehículo	***	1.4±0.16	1.35±0.20	1.3±0.09	1.45±0.30
DR	10	*19.15±0.26	*21.72±0.29	*24.3±0.31	*22.82±0.22
PT/DR	100/10	7.66±0.17	7±0.21**	5±0.07*	6±0.16**
PT/DR	200/10	5.55±0.25**	6.33±0.08**	6.17±0.22**	6±0.23**
PT/DR	300/10	5.17±0.12**	4.5±0.11**	4.31±0.28**	4.4±0.22**
PT/DR	600/10	2.1±0.23**	2.7±0.20**	3.78±0.1**	3±0.12**

*Diferencia estadísticamente significativa con respecto al testigo negativo ANOVA y t de Student, p = <0.05.

**Diferencia estadísticamente significativa con respecto al testigo positivo ANOVA y t de Student, p = <0.05.

***0.40 ml de agua inyectable

Referente a la frecuencia de eritrocitos policromáticos (EPC), los resultados se indican en la tabla 6, la frecuencia obtenida con el grupo control positivo demostró una disminución significativa hasta 5.33±0.26 EPC en 24 h en relación al control negativo, sin embargo al administrar pteropodina y doxorubicina se observa un aumento estadístico significativo (p> 0.05) en el número de EPC así mismo en la relación eritrocitos policromáticos/eritrocitos normocromáticos (EP/ENC) con las cuatro dosis probadas, hasta valores cercanos al grupo control, el incremento mayor se observó con la dosis de 600 mg de PT y 10 mg de DX con un valor de 18.4±0.15 MN (tabla 6) .

Tabla 6. Frecuencia de eritrocitos policromáticos en la relación eritrocitos normocromáticos (EPC/ENC) de ratones tratados con pteropodina (PT) y doxorubicina (DR)

Agente	Dosis mg/kg	EPC/ENC ± S.D.			
		24 h	48 h	72 h	96 h
Vehículo	***	19.5±0.11	20.33±0.11	20.16±0.04	21.4±0.32
DR	10	5.33±0.26*	6.1±0.12*	7.6±0.22*	6.06±0.11*
PT/DR	100/10	8.5±0.22**	9.16±0.08**	10.53±0.29**	8.89±0.2**
PT/DR	200/10	9.83±0.20**	11.3±0.24**	10.83±0.24**	10.4±0.26**
PT/DR	300/10	12.1±0.06**	15.6±0.21**	16.3±0.22**	16.7±0.05**
PT/DR	600/10	18.4±0.15**	17.1±0.16**	16.5±0.24**	16.8±0.18**

*Diferencia estadísticamente significativa con respecto al testigo negativo ANOVA y t de Student, p = <0.05.

**Diferencia estadísticamente significativa con respecto al testigo positivo ANOVA y t de Student, p = <0.05.

***0.40 ml de agua inyectable.

7.1.3. DETERMINACION DE LINFOCITOS TOTALES EN SANGRE PERIFÉRICA

La proliferación de linfocitos totales se incrementó significativamente ($p < 0.05$) hasta un 35% con respecto al grupo negativo (tabla 7). Cuyos valores se ubicaron entre 58.5 ± 0.22 y 78.8 ± 0.08 con las diferentes dosis de tratamiento, el grupo control positivo presentó valores ubicados entre 50.33 ± 0.26 y 60.6 ± 0.22 , el grupo testigo negativo obtuvo un valor mínimo de 44.5 ± 0.10 y un máximo de 47.4 ± 0.02 .

Tabla 7. Frecuencia de linfocitos totales en ratones tratados con pteropodina (PT)

Agente	Dosis	Linfocitos totales $\bar{X} \pm S.D.$			
		24 h	48 h	72 h	96 h
Vehículo	*	44.5 ± 0.10	45.33 ± 0.21	46.16 ± 0.14	47.4 ± 0.02
Interferon alfa	0.01 $\mu\text{l/kg}$	50.33 ± 0.26	$56.1 \pm 0.22^{**}$	$60.6 \pm 0.22^{**}$	$56.06 \pm 0.11^{**}$
PT	100 mg/kg	$58.5 \pm 0.22^{**}$	$61.16 \pm 0.08^{**}$	$66.53 \pm 0.09^{**}$	$68.89 \pm 0.12^{**}$
PT	200 mg/kg	$59.83 \pm 0.20^{**}$	$61.3 \pm 0.24^{**}$	$65.83 \pm 0.24^{**}$	$74.4 \pm 0.26^{**}$
PT	300 mg/kg	$62.1 \pm 0.06^{**}$	$65.6 \pm 0.21^{**}$	$74.3 \pm 0.22^{**}$	$76.7 \pm 0.03^{**}$
PT	600 mg/kg	$68.4 \pm 0.15^{**}$	$67.1 \pm 0.16^{**}$	$72.5 \pm 0.24^{**}$	$78.8 \pm 0.08^{**}$

*0.40 ml de agua inyectable

**Diferencia estadísticamente significativa con respecto al testigo negativo ANOVA y t de student, $p = < 0.05$.

7.1.4. DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

Por otro lado se observó efecto antioxidante en presencia del radical DPPH al presentar una disminución significativa ($p < 0.001$) en la absorbancia del compuesto, comparado con el grupo control (tabla 8) con valores entre 29.02 ± 0.002 y 98.26 ± 0.002 con las diferentes dosis de tratamiento, el grupo control positivo presentó valores ubicados entre 5.9 ± 0.002 y 76.12 ± 0.001 .

Tabla 8. Efecto in vitro del barrido del radical libre de pteropodina por método de DPPH verificar valores

	% absorbancia $\bar{X} \pm DE.$						
concentración	4 $\mu\text{g/ml}$	8 $\mu\text{g/ml}$	15 $\mu\text{g/ml}$	30 $\mu\text{g/ml}$	60 $\mu\text{g/ml}$	125 $\mu\text{g/ml}$	250 $\mu\text{g/ml}$
Pteropodina	$29.02 \pm 0.002^*$	$32.85 \pm 0.001^*$	$37.3 \pm 0.003^*$	$44.6 \pm 0.002^*$	$53.44 \pm 0.001^*$	$79.12 \pm 0.002^*$	$98.26 \pm 0.002^*$
concentración	0.1 $\mu\text{g/ml}$	0.2 $\mu\text{g/ml}$	0.4 $\mu\text{g/ml}$	0.6 $\mu\text{g/ml}$	0.8 $\mu\text{g/ml}$	1 $\mu\text{g/ml}$	
Vitamina C	5.9 ± 0.002	13.56 ± 0.001	28.51 ± 0.003	46.16 ± 0.003	62.14 ± 0.001	76.12 ± 0.001	

**Diferencia estadísticamente significativa con respecto al testigo negativo ANOVA y t de Student, ($p < 0.001$). corroborar datos son los mismos de BS

7.2. BETA-SITOSTEROL

7.2.1. EVALUACIÓN GENOTOXICA

La DL50 para beta-sitosterol fué de 1250 mg/kg de peso. Los resultados demostrarán que beta-sitosterol induce ICH, observándose un comportamiento similar al grupo control negativo con las cuatro dosis de prueba, cuyos valores se ubicaron entre 1.34 ± 0.24 y 2.12 ± 0.28 (tabla 10) sin significancia estadística, el testigo positivo administrado con el antineoplásico doxorubicina mostró un incremento significativo ($p < 0.05$) comparado con todos los grupos tratados, cuyo valor se ubico en 16.83 ± 0.42 (tabla 4). En la cinética de proliferación no se observó modificación del ciclo celular con las dosis probadas y el índice mitótico no presentó datos citotóxicos (tabla 9).

Tabla 9. Frecuencia de ICH, cinética de proliferación e índice mitótico en médula ósea de ratones administrados con beta-sitosterol.

Agente	Dosis (mg/kg)	ICH X ± d. e.	Cinética			TPG X ± d. e.	Índice mitótico X ± d.e.
			M1	M2	M3		
Vehículo	0**	2.82 ± 0.12	36	50	14	12.25 ± 0.23	5.63 ± 0.37
Beta-sitosterol	200	2.12 ± 0.28	32	53	15	12.14 ± 0.17	5.66 ± 0.29
Beta-sitosterol	400	1.54 ± 0.21	36	50	14	12.45 ± 0.12	5.70 ± 0.18
Beta-sitosterol	600	1.34 ± 0.24	34	55	11	12.55 ± 0.10	5.58 ± 0.33
Beta-sitosterol	1000	1.0 ± 0.34	33	52	15	12.35 ± 0.18	6.03 ± 0.22
Doxorrubicina	10	$16.83 \pm 0.42^*$	33	58	9	12.37 ± 0.31	6.43 ± 0.42

*Diferencia estadísticamente significativa con respecto al testigo negativo ANOVA y t de Student, $p = < 0.05$.

** Tiempo promedio de generación (TPG) = $21 / [(1)(M1) + 2(M2) + 3(M3)] \times 100$, donde M1, M2 y M3 corresponde a la frecuencia de metafases de 1a, 2a y 3ª división respectivamente. **Corresponde a 0.45 ml del vehículo. La frecuencia de ICH se contabilizó en 300 metafases de 2ª división, la cinética de proliferación celular en 500 metafases y el índice mitótico en 5000 células por lote.

La frecuencia de MN en el grupo testigo negativo presentó un promedio de 1.35, y se incrementó significativamente ($p < 0.05$) al administrar doxorubicina hasta 22.0 (tabla 10).

Tabla 10. Frecuencia de micronúcleos en ratones administrados con beta-sitosterol y doxorubicina.

Agente	Dosis (mg/kg)	Frecuencia de micronúcleos			
		24 h	48 h	72 h	96 h
Vehículo	0**	1.6±0.26	2.05±0.18	1.74±0.21	1.1±0.32
Beta-sitosterol	200	1.13±0.15	0.83±0.31	0.83±0.15	1±0.42
Beta-sitosterol	400	1.33±0.21	1.03±0.33	1.0±0.43	1.33±0.32
Beta-sitosterol	600	1.40±0.19	1.53±0.18	1.20±0.23	1.0±0.17
Beta-sitosterol	1000	1.7±0.17	1.3±0.24	1.4±0.24	1.0±0.26
Doxorrubicina	10	18.26±0.26*	19.3±0.29*	25.4±0.31*	20.5±0.22*

*Diferencia estadísticamente significativa con respecto al testigo negativo ANOVA y t de Student, $p < 0.05$. La frecuencia de micronúcleos se contabilizó en 5000 células por lote

La frecuencia de eritrocitos policromáticos en la relación eritrocitos policromáticos/Eritrocitos normocrómicos (EPC/ENC) entre el grupo testigo negativo y los grupos con tratamiento no presentaron diferencia significativa y cuyos valores se ubicaron entre 17 y 22.5 (tabla 11), el testigo positivo presentó una disminución significativa en la relación de EPC/ENC con todos los grupos de tratamiento con valores promedio de 7.01 (tabla 12). Estos resultados sugieren que beta-sitosterol no es genotóxico con las dosis probadas lo que nos ofrece cierta seguridad para su uso, por lo que se procedió a evaluar el efecto antígenotóxico de este compuesto.

Tabla 11. Frecuencia de eritrocitos policromáticos en la relación EPC/ENC de ratones tratados con beta-sitosterol y doxorubicina.

Agente	Dosis (mg/kg)	Frecuencia de EPC			
		24 h	48 h	72 h	96 h
Vehículo	0**	20.13 ± 0.23	21.10 ± 0.14	20.5 ± 0.08	21.13 ± .26
Beta-sitosterol	200	19.8 ± 0.46	18.8 ± 0.17	17.0 ± 0.42	19.5 ± 0.28
Beta-sitosterol	400	20.3 ± 0.43	19.7 ± 0.52	19.16 ± 0.11	20.0 ± 0.48
Beta-sitosterol	600	20.0 ± 0.19	19.5 ± 0.44	19.83 ± 0.61	21.0 ± 0.12
Beta-sitosterol	1000	22.0 ± 0.43	20.3 ± 0.19	20.14 ± 0.05	21.3 ± 0.57
Doxorrubicina	10	*9.1 ± 0.37	*7.33 ± 0.61	*5.33 ± 0.33	*6.36 ± 0.42

*Diferencia estadísticamente significativa con respecto al testigo negativo ANOVA y t de Student, $p < 0.05$. La frecuencia de micronúcleos se contabilizaron en 5000 células por lote

7.2.2. EVALUACION ANTIGENOTÓXICA DE BETA-SITOSTEROL

Los resultados de la prueba de ICH para determinar el efecto antigenotóxico de betasitosterol contra doxorubicina, se muestran en tabla 12, BS demostró actividad antimutagénica en todas las concentraciones probadas, al reducir las frecuencias de los ICH entre un 81 y 87 % respecto al control positivo. La reducción más alta fue obtenida con las concentraciones de 600 y 1000 mg/kg de BS y 10 mg/kg de doxorubicina. Las reducciones más bajas ocurrieron a las 24 h de tratamiento (3.17 ICH) por lo tanto, todos los índices de la reducción de las frecuencias de ICH fueron 80% mayor que el grupo positivo.

Tabla 12. Intercambio de cromátidas hermanas (ICH), tiempo promedio de generación (TPG), e índice mitótico (IM) en médula osea de ratón administrados con beta-sitosterol (BS) y doxorubicina (DR).

Agente	Dosis (mg/kg)	ICH X ± SD	M1 %	M2	M3	TPG X ± SD	IM X ± SD
AM		2.82 ± 0.12	36	50	14	12.25 ± 0.23	5.63 ± 0.37
BS/DR	200/10	**3.17 ± 0.29	33	58	14	12.60 ± 0.27	5.85 ± 0.28
BS/DR	400/10	**2.98 ± 0.26	31	53	16	12.43 ± 0.18	6.02 ± 0.22
BS/DR	600/10	**2.21 ± 0.23	36	52	12	12.40 ± 0.16	6.32 ± 0.31
BS/DR	1000/10	**2.21 ± 0.32	34	50	16	12.54 ± 0.26	5.43 ± 0.26
DR	10	*16.83 ± 0.42	33	58	9	12.37 ± 0.31	6.43 ± 0.41

0.40 ml de aceite mineral (AM). M1, M2, and M3 = células de primera, segunda y tercera división. $TPG = \frac{21}{M1} + \frac{2M2}{100} + \frac{3M3}{100}$

*Diferencia estadísticamente significativa con respecto al testigo negativo ANOVA y t de Student, $p < 0.05$.

**Diferencia estadísticamente significativa con respecto al testigo positivo ANOVA y t de Student, $p < 0.05$.

La frecuencia de micronúcleos se incrementó significativamente ($p < 0.05$) al administrar doxorubicina hasta 25.4 ± 0.31 , sin embargo estos valores disminuyeron al administrar betasitosterol y doxorubicina hasta valores cercanos al obtenido con el grupo control (tabla 13).

Tabla 13. Frecuencia de micronúcleos (MN) en ratones administrados con beta-sitosterol (BS) y doxorrubicina (DR)

Agente	Dosis Mg/kg	MN X ± S.D.			
		24	48	72	96 h
AM		1.3±0.16	2.15±0.18	1.64±0.21	1.1±0.35
BS/DR	200/10	**5.7±0.25	**6±0.30	**5.3±0.15	**7.3±0.32
BS/DR	400/10	**5.43±0.21	**5±0.38	**4.8±0.28	**6.2±0.29
BS/DR	600/10	**4.93±0.19	**4.8±0.28	**4.2±0.26	**4±0.37
BS/DR	1000/10	**2.1±0.27	**2±0.34	**1.9±0.34	**2.3±0.46
DR	10	*18.26±0.26	*19.3±0.29	*25.4±0.31	*20.5±0.22

*Diferencia estadísticamente significativa con respecto al testigo negativo ANOVA y t de Student, p = <0.05.

**Diferencia estadísticamente significativa con respecto al testigo positivo ANOVA y t de Student, p = <0.05.

0.40 ml de aceite mineral (AM).

Referente a la frecuencia de eritrocitos policromáticos (EPC), los resultados se indican en la tabla 14, la frecuencia obtenida con el grupo control positivo demostró una disminución significativa hasta 6.2 EPC a las 72 h en relación al control negativo, sin embargo al administrar betasitosterol y doxorrubicina se observa un aumento estadístico significativo (p> 0.05) en el número de EPC así mismo en la relación eritrocitos policromáticos/eritrocitos normocrómicos (EP/ENC) con las cuatro dosis probadas.

Tabla 14. Frecuencia de eritrocitos policromáticos en la relación eritrocitos normocrómicos (EPC/ENC) de ratones tratados con beta-sitosterol (BS) y doxorrubicina (DR).

Agente	Dosis mg/kg	EPC/ENC ± S.D.			
		24 h	48 h	72 h	96 h
AM	-	19.33±0.11	21.16±0.08	22.5±0.10	21.1±0.41
BS/DR	200/10	**13.1±0.26	12.8±0.19	**14.0±0.22	**13.9.5±0.28
BS/DR	400/10	**13±0.33	**15.2±0.22	**16.3±0.11	**15±0.41
BS/DR	600/10	**16.1±0.26	**16.6±0.24	**17±0.37	**16.7±0.12
BS/DR	1000/10	**18.6.0±0.33	**20±0.19	**19.3±0.35	**18.8±0.54
DR	10	*9.1±0.37	*7.33±0.61	*6.2±0.33	*6.36±0.42

*Diferencia estadísticamente significativa con respecto al testigo negativo ANOVA y t de Student, p = <0.05.

**Diferencia estadísticamente significativa con respecto al testigo positivo ANOVA y t de Student, p = <0.05.

0.40 ml de aceite mineral (AM).

7.2.3. DETERMINACION DE LINFOCITOS TOTALES EN SANGRE PERIFÉRICA

La proliferación de linfocitos totales se incrementó significativamente (p<0.05) hasta un 25% con respecto al grupo negativo (tabla 15). Cuyos valores se ubicaron entre

54.5±0.22 y 64.53±0.09, el control positivo obtuvo valores de 50.33±0.26 y hasta 60.6±0.22.

Tabla 15. Frecuencia de linfocitos totales en ratones tratados con beta-sitosterol (BS)

Agente	Dosis	Linfocitos totales X ± S.D.			
		24 h	48 h	72 h	96 h
Vehículo	***	49.5±0.10	48.33±0.21	46.16±0.14	51.4±0.02
Interferon alfa	0.01 UI/kg	50.33±0.26	56.1±0.22**	60.6±0.22**	56.06±0.11**
BS	200 mg/kg	54.5±0.22**	60.16±0.08**	64.53±0.09**	61.89±0.12**
BS	400 mg/kg	56.83±0.20**	60.3±0.24**	58.83±0.24**	60.4±0.26**
BS	600 mg/kg	58.1±0.06**	59.6±0.21**	58.3±0.22**	60.7±0.03**
BS	1000 mg/kg	60.4±0.15**	61.1±0.16**	61.5±0.24**	62.8±0.08**

**Diferencia estadísticamente significativa con respecto al testigo negativo ANOVA y t de Student, p = <0.05.

*Diferencia estadísticamente significativa con respecto al testigo positivo ANOVA y t de Student, p = <0.05.

***0.40 ml de aceite mineral.

7.2.4. DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

Por otro lado se observó efecto antioxidante en presencia del radical DPPH al presentar una disminución significativa (p<0.001) en la absorbancia del compuesto, comparado con el grupo control (tabla 16) cuyos valores se ubicaron entre 27.02±0.002 y 78.18±0.002, el ácido ascórbico presentó valores mínimos de 5.9±0.002 y máximos de 78.18±0.002

Tabla 16. Efecto in vitro del barrido del radical libre de beta-sitosterol por método de DPPH

	% absorbancia X ± DE.						
concentración	4µg/ml	8µg/ml	15µg/ml	30 µg/ml	60 µg/ml	125µg/ml	250µg/ml
Beta-sitosterol	27.02 ±0.002*	29.85 ±0.001*	31.3 ±0.00*3	38.6 ±0.002*	46.44 ±0.001*	52.12 ±0.002*	78.18 ±0.002*
concentración	0.1µg/ml	0.2µg/ml	0.4µg/ml	0.6µg/ml	0.8µg/ml	1µg/ml	
Vitamina C	5.9 ±0.002	13.56 ±0.001	28.51 ±0.003	46.16 ±0.003	62.14 ±0.001	76.12 ±0.001	

**Diferencia estadísticamente significativa con respecto al testigo negativo ANOVA y t de Student, (p<0.001). corroborar datos son los mismos de BS

8. DISCUSION

8.1. GENERAL

Existe gran cantidad de sustancias, las cuales son relevantes para la salud humana y a las que se les debe realizar ensayos toxicológicos. Algunas estimaciones señalan

que serían varios miles de compuestos a los que se les debería estudiar con alta prioridad y decenas de miles los que deberían ser investigados en el futuro. Esto representa un enorme y costoso compromiso en favor de la salud pública. Por lo tanto, en el futuro desarrollo de procedimientos toxicológicos no es suficiente adoptar más y más ensayos nuevos, las necesidades logísticas y económicas señalan que las técnicas que existen deben de tomarse en cuenta de acuerdo con su relevancia y eficacia. De manera particular, debe considerarse la importancia de la evaluación toxicológica de las sustancias químicas con apoyo en experimentos en animales. Aunque en mutagénesis química existen técnicas para utilizar cultivo de células, microorganismos, insectos y otros modelos experimentales, los experimentos toxicológicos deben incluir a los mamíferos, y por cuestiones de ética científica los ensayos deben ser planeados de tal forma que se obtenga la máxima información relevante de cada animal sacrificado (65).

8.2. DOSIS LETAL 50

La dosis letal 50 (DL50) representa la cantidad de una sustancia expresada en gr o mg capaz de matar al 50 % de los organismos inoculados con algún xenobiótico. La DL50 es una medida de uso común en Toxicología y en Farmacología, también se aplica para el cálculo de título de un virus que en ese caso sería la cantidad de virus necesaria para matar al 50% de la población, si bien la precisión de los valores de la DL50 dependen de varios factores, tales como el sexo, la especie, la edad, el estado nutricional, las vías de administración, el número de animales utilizados en la prueba, la sensibilidad de cada organismo y las variaciones experimentales internas de cada laboratorio, este ensayo es el primero que se realiza en los estudios de toxicidad aguda debido que la información que aporta es útil para el planteamiento de experimentos subsecuentes (66). Existen diferentes métodos para determinar la DL50, como son el de Lichfield y Wilcoxon, Bliss o el de Finney, los cuales se han considerado clásicos, aunque el número de animales que utilizan pueden superar los 50, sin embargo, también se puede realizar esta determinación con otros métodos que

requieren un menor número de animales, como es el procedimiento de Lorke, el cual utiliza un menor número de animales comparado con el método clásico, pero su precisión y reproducibilidad son equiparables con los obtenidos con mayor número de organismos (59, 67), en la literatura consultada no se encuentra información respecto a la DL50 de beta-sitosterol y pteropodina, por lo que se realizó esta determinación y los resultados muestran que tanto beta-sitosterol como pteropodina no presenta efectos tóxicos cuando se administran hasta 1000 mg/kg en el primer caso y 700 mg/kg en el segundo caso; este resultado sugiere cierta seguridad para su uso terapéutico, en el caso de beta-sitosterol, clasificado en el grupo de terpenoides y pteropodina es un compuesto considerado como oxindol pentacíclico, en general estos compuestos no muestran toxicidad significativa.

Beta-sitosterol frecuentemente se encuentra como suplemento alimenticio en establecimientos comerciales donde venden productos para la salud humana (57), y respecto a pteropodina no existen aun datos que se refieran a su uso para consumo humano.

En los últimos años, el consumo de plantas medicinales ha experimentado un notable incremento en la sociedad. Las plantas medicinales se comportan como verdaderos fármacos ya que las sustancias químicas que las componen pueden tener una actividad biológica en humanos. Además existen interacciones de sinergismo adición o antagonismo con compuestos de una misma planta, y al igual que las producidas entre dos o más fármacos pueden producirse por mecanismos farmacocinéticos que pueden afectar a procesos de absorción, distribución, metabolismo y excreción o farmacodinámicos, por lo tanto afectan al resultado de su acción farmacológica. En México no existen estudios que indiquen con exactitud el consumo de plantas medicinales, sin embargo se estima a través de resultados publicados tras realizar encuestas a pacientes en el ámbito de atención primaria, donde en promedio un 30% de las personas encuestadas había consumido alguna vez plantas medicinales (68, 69). Esto puede ser debido a que en algunos casos, se ha demostrado su eficacia en

el tratamiento de determinadas patologías y a la errónea percepción de la inocuidad de estos productos. Con el reconocimiento de estos beneficios aparece el reconocimiento del riesgo, cuyo conocimiento se ve dificultado porque las plantas, crudas o extractadas pueden contener mezclas complejas de sustancias químicas orgánicas que incluyen: ácidos grasos, esteroides, alcaloides, flavonoides, glucósidos, saponinas, taninos y terpenos. Cualquiera de los componentes mencionados puede tener una actividad biológica en humanos. Además, el procesamiento de estas plantas utilizando medios físicos como calentamiento o hervido puede alterar la actividad farmacológica de los constituyentes orgánicos, que también pueden verse afectados en su concentración dependiendo de factores ambientales de cultivo o localización como características del suelo, humedad y temperatura ambiente, altitud, entre otros y de la parte del vegetal utilizado (hojas, tallos, flores, raíces, semillas) (70, 71)).

8.3. GENOTOXICIDAD DE PTEROPODINA Y BETA-SITOSTEROL

Al inicio de cualquier experimento que pretenda entender los efectos de agentes químicos ambientales, se debe establecer el rango de dosis por emplear y la citotoxicidad del compuesto. Los experimentos preliminares de toxicidad generan curvas de supervivencia que son muy útiles para la selección de las concentraciones que se van a emplear. El criterio toxicológico más frecuentemente empleado es la concentración letal media, que como ya vimos está definida como aquella que produce la mitad de individuos o células muertas por el tratamiento. A partir de ella se eligen dos o tres concentraciones más, con el objeto de obtener la curva dosis-respuesta. Por ello, la utilización de concentraciones muy altas seleccionadas con base en la muerte celular puede ser muy inapropiada para algunos agentes químicos. Para que un agente químico sea lanzado al mercado debe conocerse antes su toxicidad, su destino ambiental y el uso al que va destinado. Sin embargo, si un agente químico ya está en el comercio deben definirse y cuantificarse los datos en cuanto al riesgo genético que conlleva su uso. Por otro lado los estudios genotóxicos son útiles para identificar el nivel del daño al DNA por xenobióticos, así como para obtener un indicativo sobre las

consecuencias clínicas posibles de la exposición humana (65). Particular y generalmente los estudios agudos in vivo en organismos mamíferos, se consideran importantes en el análisis de una batería jerárquica de pruebas diseñadas para determinar el potencial genotóxico previo a una evaluación antigenotóxica de un agente; en este paso, las altas dosis del compuesto probado son incluidas; sin embargo, nuevos estudios son necesarios para establecer un riesgo, es decir, incorporando variables tales como sexo, edad, dosis, tiempo y vía de administración, esto para entender mejor el potencial tóxico así como para tener más datos para una extrapolación razonable a la exposición humana. En nuestro estudio, el uso de dosis 20% menor que la LD50 obtenida para los agentes no indujo un aumento en el índice de ICH ni en EPMN del ratón, lo que indica ausencia de potencial genotóxico in vivo de los productos químicos incluso en altas dosis.

Los resultados del presente estudio revelan la utilidad de la prueba de micronúcleos en la sangre periférica para evaluar la genotoxicidad y citotoxicidad de los compuestos que se emplearon (PT, BS, DOX), lo cual coincide con el conocimiento de que los eritrocitos son células que permiten evaluar de manera eficaz alteraciones en la actividad medular y en el material genético cuando se exponen a diversos xenobióticos (62, 72). En un estudio agudo, el monitoreo de la presencia de MN en EPC se realiza debido a que estas células jóvenes (reticulocitos) son producidas y liberadas durante el tiempo del experimento; esto se deriva de las aportaciones Mac Gregor (73), en las cuales propone que los organismos estudiados deben estar en contacto con el xenobiótico el tiempo suficiente para alcanzar una condición estable, en la que las células micronucleadas alcancen su frecuencia más alta en el tejido de estudio, esta frecuencia permanece constante cuando la producción de las células que presentan el daño queda balanceada con la pérdida de la misma población celular. En términos cinéticos, el tiempo para obtener el estado estacionario en condiciones de un flujo constante de entrada hacia un compartimento está determinado por la velocidad de eliminación de ese compartimento, en el caso de los eritrocitos micronucleados su

cinética de proliferación está determinada por su lapso de vida. El tiempo que se requiere para llegar a un estado estacionario en la frecuencia de los EPC en la médula ósea, aparentemente aún no se ha establecido, pero probablemente ocurre (si el agente inductor está actuando rápidamente y no es acumulativo) cuando los períodos de dosificación excedan el tiempo de vida de los EPC en la médula ósea más el tiempo requerido para completar una división celular y una expulsión nuclear (72). De tal forma que se ha sugerido que la frecuencia del estado estacionario de los EPCMN en la médula ósea debe ser alcanzada en aproximadamente 2 días, después del inicio del tratamiento (62), esta aseveración se realizó considerando que un ciclo celular de vida de los eritrocitos dura entre 10 y 20 hrs, que el proceso de la división a la enucleación ocurre aproximadamente en 6 hrs. y que los EPC tienen un tiempo de vida entre 10 y 30 hrs. en la médula ósea (62,72). Sin embargo, se han encontrado diferencias entre los agentes probados, respecto al tiempo donde se observa el máximo de la frecuencia de micronúcleos después del tratamiento, por lo que es importante que se evalúen más de 2 muestras después de la administración. En base a lo anterior, en nuestro estudio se obtuvieron muestras sanguíneas antes de administrar los compuestos, así como a las 24, 48, 72 y 96 hrs. después de los tratamientos y los resultados obtenidos respecto a PT Y BS indican que no son compuestos genotóxicos, puesto que la frecuencia máxima de los micronúcleos que presentó en la sangre periférica de ratón fue de 1.71 ± 0.28 EPCMN para PT a las 72 hrs. con la dosis de 300 mg/Kg y de 1.7 ± 0.17 EPCMN para BS a las 24 hrs con la dosis de 1000 mg/Kg, mientras que en el grupo testigo la máxima inducción corresponde a 2.05 ± 0.18 EPCMN a las 48 hrs.

Por otro lado nuestros resultados obtenidos con ICH indica la inocuidad del compuesto tomando en cuenta que los intercambios entre cromátidas hermanas son la manifestación citológica de la rotura de la doble hélice del ADN y la reorganización entre sitios homólogos de las dos cromátidas de un cromosoma. Estos cambios, que

no alteran la polaridad, la estructura de la doble hélice del ADN ni la morfología de los cromosomas, pueden visualizarse mediante tinción específica por fluorescencia y/o Giemsa en linfocitos de sangre periférica o de médula ósea, que han sufrido dos ciclos celulares (60). Los agentes denominados S-dependientes son eficaces inductores de intercambios de cromátidas hermanas (74). Al igual que para las aberraciones cromosómicas, la lesión que conduce al intercambio puede haber sido originada en cualquier fase del ciclo celular aunque no se manifiesta citológicamente hasta que la célula entra en división y atraviesa la fase S. Frente a determinados agentes químicos, la inducción de intercambios de cromátidas hermanas puede presentar una mayor sensibilidad que las aberraciones cromosómicas, pudiendo manifestarse efectos genotóxicos a concentraciones hasta 100 veces menores a las necesarias para producir las aberraciones cromosómicas (75).

Los intercambios de cromátidas hermanas no son sucesos letales para la célula y, probablemente, no presentan ninguna relación con la citotoxicidad. Además, por sí mismos, no pueden ser considerados mutaciones ya que, en principio, no producen cambios en la información genética. Sin embargo, se ha observado que la frecuencia de intercambios de cromátidas hermanas aumenta cuando las células son expuestas a agentes mutágenos y cancerígenos conocidos (76). Este ensayo biológico permite detectar lesiones en los cromosomas por lo que se considera una eficaz herramienta por la Environmental Protection Agency (EPA) y la comunidad científica para evaluar la genotoxicidad.

Los Micronúcleos representan fragmentos del cromosoma o los cromosomas enteros segregados anormalmente a las células hijas durante la mitosis, y aunque la formación de ICH no se entiende claramente, se relaciona generalmente con la rotura del DNA (62).

Así, con la presente investigación se demuestra que la PT y el BS no son genotóxicos con las dos pruebas citogenéticas realizadas, lo cual coinciden con estudios *in vitro* realizados en otros esteroides donde no se ha presentado daño genético.

Con respecto a la citotoxicidad de PT y BS, en la evaluación de EPC/ENC se observó que no se modificó observándose una frecuencia de eritrocitos policromáticos en la relación epc/enc de 14.9 ± 0.61 a las 24 hrs con PTy un máximo de 22.0 ± 0.55 a las 48 hrs con la dosis de 600 mg/kg de PT. respecto a bs se observo un valor mínimo de 17.0 ± 0.42 a las 72 hrs con la dosis de 200 mg/kg de BS y un valor máximo de 22.0 ± 0.43 a las 24 hrs con la dosis de 1000 mg/kg de BS, de igual manera, tampoco se vio afectado el TPG ni el IM en ambos compuestos los cuales tuvieron un comportamiento homogéneo y sin significancia estadística con todos los compuestos probados. Resultados que coinciden con otros estudios en donde la citotoxicidad en del extracto de UT fue evaluada por cuatro sistemas: Análisis rojo neutral (NR), contenido proteínico total (KB), análisis del tetrazolium (MTT) y prueba de Microtox. Los extractos del UT no presentaron toxicidad *in vitro* en las concentraciones probadas. Aunque la prueba *in vitro* es una herramienta valiosa para evaluar la toxicidad de plantas medicinales, las pruebas *in vivo* realizadas en nuestro estudio refuerzan estos resultados, ya que BS y PT los cuales son componentes mayoritarios de UT, no presentaron datos genotóxicos ni citotóxicos con las dosis administradas (77). Sin embargo, aunque la citotoxicidad indicada por apoptosis creciente y la disminución de la viabilidad de la célula se ha observado, esto puede ser probablemente a la inhibición de 3 - hydroxy-3-methyl-glutaryl-coenzyme A debido a la producción de radicales libres.

Con respecto a la PT y a otros oxindoles, un efecto citotóxico débil también se ha observado (78). Estos datos, determinados en cultivo de células, confirma la importancia de estudiar el efecto de mutágenos en modelos *in vivo* debido a la influencia de los procesos de la biotransformación y de la desintoxicación en organismos vivos. Los datos negativos obtenidos en el actual estudio del potencial genotóxico y citotóxico de los compuestos probados refuerzan, con más certeza, el desarrollo de la investigación con el enfoque siguiente: para determinar la actividad farmacológica y quimiopreventiva de BS y de PT, así como la de las plantas que

contienen estas sustancias, conduciendo a una extrapolación posible a los seres humanos.

8. 4. EFECTOS BIOLÓGICOS DE PTEROPODINA

8.4.1. EFECTO ANTIGENOTOXICO

Los resultados de la actual investigación con respecto la antigenotoxicidad de la PT, muestran una protección eficaz. Estos resultados sugieren que PT es un antimutágeno efectivo en el modelo empleado, ya que con la técnica de ICH se observó una reducción en el daño del DNA al administrar confirmado estadísticamente (tabla 4). Por otra parte al ejercer una protección de las células contra sustancias clastogénicas que causan la formación de los micronúcleos (tabla 5). En este sentido existen algunos trabajos que demuestran el efecto de extractos y de fracciones cromatográficas de la corteza de la UT divulgados por Rizzi y col. (44), en donde las fracciones de la planta no muestran ningún efecto mutágeno en diversas cepas de *Salmonella typhimurium*. Sin embargo, los extractos y las fracciones de la planta demuestran un efecto antimutagénico protector *in vitro* contra el daño genotóxico con fotomutagénesis inducida con 8 methoxy-psoraleno (8-MOP) más UVA en *Salmonella typhimurium* (TA102) (44). Por otra parte Sheng y col. estudió los extractos de UT (C-Med-100) y demostró un efecto protector al daño en DNA, y mejor recuperación de la respuesta después de la quimioterapia *in vivo* (46), además existen antecedentes de que pteropodina e isopteropodina (uncarinas C y E) exhiben bajos pero consistentes efectos citotóxicos en fibroblastos de ratones y en las líneas de células tumorales humanas (carcinoma de células pulmonares -excepto a células pequeñas, carcinoma cervical, carcinoma prostático) y de ratones (linfosarcoma reticular, carcinoma estomacal); estos alcaloides también pueden inhibir la topoizomerasa I (78); en nuestro estudio los resultados son similares y el efecto antimutagénico de la UT podría estar dado por la fracción de oxindoles pentacíclicos y esteroides. El actual trabajo sugiere la presencia de pteropodina en la fracción pentacíclica y su participación en los efectos biológicos observados, puede deberse a que actúan solos o junto con otros

componentes, además, al parecer una o más sustancias con características antimutagénicas están presentes en los extractos orgánicos de UT.

8.4.2. EFECTO ANTIOXIDANTE

La UT ha sido referida por Goncalves y col., (80) como un potente antioxidante, debido a su alta capacidad de reducir el radical libre de DPPH, y por su reacción con el anión superóxido, radicales peroxi y oxidrilo, así como con la especie oxidante de peróxido de hidrógeno. Por otro lado el organismo humano, al presentar metabolismo aeróbico, posee sistemas detoxificadores o antioxidantes propios, conocidos también como "scavengers" (depuradores). Entre ellos tenemos los sistemas enzimáticos, como la catalasa, presente únicamente en los peroxisomas que son sacos membranosos que contienen una gran diversidad de enzimas, y la superóxido dismutasa (SOD), aunque esta enzima genera peróxido de hidrógeno que en presencia de hierro libre presenta una acción pro-oxidante. También tenemos sistemas que actúan protegiendo a las células frente a la peroxidación lipídica; en este caso resultan especialmente idóneos los tocoferoles y fitosteroles. El ácido ascórbico (vitamina C), los carotenos, el ácido úrico, la albúmina, los ácidos grasos y la taurina son también algunos de los antioxidantes importantes, aunque en mucho menor grado que los tocoferoles y fitosteroles.

En este trabajo, se evaluó y demostró la capacidad antioxidante de pteropodina, frente al radical DPPH. Este análisis proporcionó la información útil en la reactividad del compuesto de los radicales libres estables. Como el electrón se apareó en presencia del barrido del radical libre, la absorción desaparece y la decoloración que resulta coincide respecto al número de electrones tomados.

8.4.3. EFECTO INMUNOLÓGICO

Respecto a los antecedentes inmunológicos que orientan hacia una actividad positiva de los compuestos de nuestra evaluación, estudios recientes demuestran que el alcaloide pteropodina, junto con otros tres alcaloides, presentan una elevada actividad fagocitaria (capacidad de atacar y destruir células extrañas por parte de los glóbulos

blancos de la sangre). Este mecanismo de acción fisiológica, indica su efecto estimulante del sistema inmunitario (49).

Keplinger y col. Determinaron que los alcaloides pentacíclicos de oxindoles, dentro de los cuales se encuentra pteropodina, tienen un efecto estimulante no específico del sistema inmunológico, al demostrar un aumento porcentual substancial de la fagocitosis y quimioluminiscencia *in vitro* y un alto aumento de la actividad de la fagocitosis de los macrófagos del tejido fino del sistema retículoendotelial (49). Así mismo Keplinger, K. 1982, realizó ensayos con extractos acuosos de UT, los que mostraron actividades citostáticas, contraceptivas y antiinflamatorias (49).

Dariusz Bednarek y col demostraron en la evaluación de la expresión superficial de marcador en linfocitos de sangre total, algunos cambios significativos como resultado con el tratamiento UT en animales. En el grupo tratado, el número total de las células de CD2 (linfocitos T) y el porcentaje de las células de CD4 (linfocitos T cooperadores) eran perceptiblemente más altos al final del tratamiento, con respecto a valores respectivos inicialmente. Estos cambios no fueron observados en el grupo control negativo (81). Wurm et al demostró en un estudio que los alcaloides pentacíclicos de UT incrementan perceptiblemente la proliferación de linfocitos B y T mientras que la viabilidad de la célula no fue afectada (82). Por su lado Keplinger y col. demostraron que los alcaloides oxindólicos pentacíclicos estimulan las células endoteliales *in vitro* al producir un factor de linfocito-proliferación-regulación. Una normalización significativa del porcentaje de linfocito fue observada *in vivo* aunque los números totales del leucocito no cambiaron (83).

En un estudio que realizó Lemaire y col. las preparaciones de la planta estimularon grandemente la producción IL-1 e IL-6 por los macrófagos de la rata de una manera dependiente de la dosis además incrementaron también IL-1 y -6 en macrófagos lipopolisacárido-estimulantes (45). Los resultados sugieren una acción inmunoestimulante fuerte de esta planta.

En un estudio con ratas hembras que fueron administradas diariamente con extracto soluble en agua (C-MED-100) de UT en dosis de 0, 5, 10, 20, 40 y 80 mg/kg por 8 semanas consecutivas. La proliferación linfocito estimulante de fitohemaglutinina (PHA) también aumentó perceptiblemente los esplenocitos de ratas tratadas en dosis de 40 y 80 mg/kg. Las células blancas (WBC) de los grupos con tratamiento de C-MED-100 con 40 y 80 mg/kg por 8 semanas o de 160 mg/kg por 4 semanas fueron incrementadas significativamente comparadas con los controles ($P < 0.05$) (84) (Sheng et al.)

Tomando en cuenta los anteriores estudios inmunológicos de la UT, este trabajo refuerza los resultados anteriormente obtenidos, ya que el compuesto ejerció un efecto inmunoestimulante al favorecer la proliferación de linfocitos totales en el modelo empleado (tabla 7). Los resultados del presente estudio tienen correlación de pteropodina con el uso terapéutico de la uña de gato, planta que pertenece a la familia de las *Rubiaceas*, las cuales son ricas en esteroides, flavonoides, y oxindoles pentacíclicos, y pteropodina es un componente natural derivado de la UT lo cual puede estar relacionado con la actividad antiinflamatoria, antioxidante e Inmunoestimulante de esta planta.

8. 5. EFECTOS BIOLÓGICOS DE BETASITOSTEROL

8.5.1. En animales, los esteroides de planta han demostrado las características antiinflamatorias, anti-neoplásica, anti-piréticas e inmunomoduladoras (52), la acción antiinflamatoria es la más relevante por su actividad en la hiperplasia prostática benigna (BPH). En un ensayo humano, los esteroides de planta contradijeron la respuesta inflamatoria del esfuerzo del maratón. Más específico a la próstata, beta-sitosterol tiene un efecto de modulación *in vitro* del factor de crecimiento prostático y la actividad de una proteincinasa (α de C) en los cultivos de células primarias de estroma (85). En otro ensayo se reclutaron a 200 pacientes con BPH sintomático, originalmente 117 de estos pacientes estaban disponibles después de la inscripción original. Se seleccionaron al azar y fueron tratados un grupo con β -sitosterol (60

mg/día) y otro con placebo durante 6 meses. Después de eso, la administración se suspendió y se invitó a que continuaran la terapia indefinidamente. Los pacientes con el tratamiento activo habían tenido las disminuciones significativas de síntomas, del volumen de la orina residual y un aumento en flujo máximo de orina. Después de 18 meses, los que estaban en tratamiento activo y habían continuado no tenían ninguna sintomatología urinaria. Los que habían estado en el tratamiento activo pero lo habían discontinuado tenían síntomas leves y disminución del volumen residual de orina pero mantuvieron su flujo máximo anterior de la orina (86, 87, 88). Hay poca evidencia hasta ahora si esta influencia positiva de los esteroides vegetales extiende las ventajas protectoras o terapéuticas para el cáncer de la próstata. Hay una cierta evidencia epidemiológica y en animales para apoyar esta teoría, aunque la epidemiología es complicada por el hecho de que los esteroides de planta son apenas un tipo de fitoestrógeno, una clase de alimento con la asociación protectora contra el cáncer de la próstata. Los mecanismos posibles de cualquier efecto específico del fitosterol incluyen la modulación de la membrana y el estímulo del apoptosis de las células de cáncer prostático y del estímulo inmunológico. Hay también una cierta evidencia de que los fitosteroides pueden ayudar en la prevención de otras formas de cáncer como por ejemplo el cáncer de mama (89, 90). Keplinger, K. 1982 realizó ensayos con extractos acuosos de uña de gato los que mostraron actividad citostática, contraceptiva y antiinflamatoria (91). La investigación en la fracción esteroidea de UT llamada uña de gato, demostró la presencia de beta-sitosterol (el 66%), estigmasterol, y campesterol. Las investigaciones farmacológicas preliminares prueban una actividad antiinflamatoria moderada (92, 93). Por otra parte, analizando la antigenotoxicidad de BS, la prueba de ICH demostró una reducción en el daño del DNA y confirmado estadísticamente. Al respecto el efecto mutagénico y antimutagénico de extractos y de fracciones cromatográficas de la corteza de UT son divulgados por Rizzi et al. en donde comprobó que los extractos y las fracciones de la planta no ejercen ningún efecto mutágeno en diversas cepas de *salmonelas typhimurium* con y sin activación

metabólica. Sin embargo, los extractos de la planta y las fracciones demuestran un efecto protector *in vitro* en fotomutagénesis inducido por 8-metoxypsoraleno (8-MOP) más UVA en *S. TA typhimurium* (44). En otro estudio una decocción del UT ingerido diariamente por 15 días en un fumador disminuyó la mutagenicidad inducida en *S. typhimurium* TA98 y TA100 en la orina (44). Por otra parte Sheng et al. estudió extracto UT (C-Med-100) y se demostró que incrementa la reparación del DNA, la respuesta mitogénica y la recuperación del leucocito después de daño por quimioterapia-inducida al DNA *in vivo*. En esos estudios, el efecto del suplemento C-Med-100 fue evaluado en un estudio voluntario humano, la reparación del DNA después de la inducción del daño al DNA por una dosis estándar de peróxido de hidrógeno fue medida, hubo una disminución estadística significativa del daño y un aumento concomitante de la reparación al DNA en los grupos del suplemento, comparado con los controles no-suplementados ($p < 0.05$) (84). Tomado junto, este ensayo ha confirmado los resultados anteriores obtenidos en el modelo de la rata al estimar el aumento en la reparación del DNA por C-Med-100, en nuestro estudio los resultados son probablemente similares a éstos detectados y el efecto sobre antimutagenicidad de la uña de gato se podría hacer por la fracción de los esteroides. El actual trabajo sugiere la presencia de beta-sitosterol en la fracción del esteroide y los extractos usados, y su participación en los efectos biológicos observados, podrían actuar solos o junto con otros componentes. Las respuestas celulares obtenidas con micronúcleos e ICH se podrían relacionar con los diversos límites evaluados en cada prueba, puesto que las lesiones detectadas por el análisis de ICH son las roturas del filamento del DNA, que no son necesariamente iguales a la de los micronúcleos (fragmentación o dispersión cromosómica de cromosomas enteros). Como resultado de lo encontrado en este protocolo, podría conducir a una manera mejor de examinar los mecanismos de antimutagénesis de la sustancia probada, puede actuar directamente en la molécula mutágena haciéndola inactiva (desmutágeno) o, indirectamente, bloqueando el proceso mutagénico aumentando la fidelidad en la

réplica del DNA o estimulando la reparación sin error del daños del DNA (bio-antimutagénesis) (De Flora, 1998) (94). Relacionado con esto, la desmutagénesis se podía detectar con el pre-tratamiento y el tratamiento simultáneo, mientras que bio-antimutagénesis se podía detectar mejor con el post-tratamiento. Por otra parte, los resultados obtenidos con este tratamiento no diferenciaron bastante para sugerir la acción exacta del mecanismo en la protección contra doxorubicina. Al parecer, en este caso, ambos mecanismos están presentes, según lo sugerido previamente por Hayatsu y col. (96, 97) y Sasaki y col. (1994) (74). En el actual trabajo BS demostró la eficacia más alta, y sugiere que la presencia de esta misma sustancia en el esteroil utilizado y su participación en los efectos biológicos observados. Además, al parecer una o más sustancias con las características antigenotóxica están presentes en los extractos orgánicos de la UT.

8.5.2. EFECTO ANTIOXIDANTE

Por otro lado el efecto observado en la prueba DPPH nos indica que beta-sitosterol actúa como antioxidante al presentar un efecto positivo, incluso superior al testigo positivo. También debemos destacar al glutati6n (GSH), un tripéptido sintetizado en el hígado que contiene un grupo sulfhidrilo (-SH) que lo hace id6neo para atenuar el efecto de los radicales libres y que es elemento central de muchos sistemas detoxificadores enzimáticos (GSH peroxidasa y GSH reductasa ligadas al selenio). No obstante, si la concentración de tocoferoles es suficiente, actúan éstos como sistemas de primera elecci6n, disminuyendo la actividad de las glutati6n peroxidasa y reductasa que, por otra parte, dependen de la concentraci6n tisular en selenio, por lo que podría ser éste un factor limitante en su formaci6n. De todo ello se deduce que si tenemos en nuestro cuerpo la cantidad necesaria de tocoferoles y fitosteroles, éstos cederán electrones a los radicales libres, estabilizándolos para que no sean perjudiciales, lo que impedirá a su vez una reacci6n en cadena. Ahora bien, tomando en cuenta que hay situaciones fisiológicas y psicológicas que aumentan, en gran medida, la formaci6n de radicales libres, entre ellas citaremos: situaciones de estrés, ejercicio

físico, arteriosclerosis, infecciones, trastornos de tipo reumático y autoinmunes, procesos degenerativos, inflamaciones locales, tabaco, contaminación, radiación solar (rayos UVA), ingestión de frituras y alimentos con mayor o menor nivel de oxidación no detectable organolépticamente. Se deduce de ello que será en estas situaciones cuando más aumentará la demanda de sustancias antioxidantes, capaces de frenar o impedir el daño celular producido por el incremento en la formación de radicales libres. Consecuentemente, se aprecia con claridad la importancia que presenta, para el ser humano, el consumo de sustancias con propiedades antioxidantes, combatiendo directamente a los radicales libres y a su vez evitando la depleción de los antioxidantes propios.

8.5.3. EFECTO INMUNOESTIMULANTE

Por otro lado y tomando en cuenta la relación que existe del sistema inmunológico con la protección celular ante un daño genotóxico, los resultados positivos de este estudio en la evaluación inmunológica, da una pauta para continuar con la investigación en este aspecto para beta-sitosterol y determinar de que manera logra influir para que el daño al DNA se revierta. Otros estudios por lo tanto se requieren para sustentar mejor las características de BS y el uso de diversos sistemas de pruebas, así como otros protocolos experimentales y otros límites, para contribuir a los nuevos descubrimientos con resultados terapéuticos.

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Solari, Alberto Juan. (2004) Genética Humana. Fundamentos y Aplicaciones en Medicina. Editorial Médica Panamericana, S. A. 3ª edición.
2. Casarett & Doull. (2001) Manual de Toxicología. Klaassen. Editorial McGraw-Hill. 5ª edición.
3. Orozco, E. y Gariglio, P. (1999) Genética y Biomedicina Molecular. Noriega Editores, México.
4. Nelson, David I. y Cox, Michael M. (2005) Principios de Bioquímica, Leningher. Ediciones Omega, S. A., 4ª edición.

5. Griffiths, A. J. F., J. H. Miller, D. T. Suzuki, R. C. Lewontin y W. M. Gelbart. (2004) *Genética*. Editores: W. H. Freeman. 8ª Edición.
6. Lacadena, J. R. (1999) *Genética General. Conceptos fundamentales*. Editorial Síntesis, S. A.
7. Falconer D. S. y T.F.C. MacKay. (1996) *Introducción a la Genética Cuantitativa*. Editorial ACRIBIA , España.
8. Hartl d. L. & Jones E.W. (2002) *Essential Genetics, a Genomic Perspective*, Jones&Bartlett Publishers. Boston.
9. Burleson, G, A Munson, J Dean. (1995) *Modern Meth0ds in Immunotoxicology*. Nueva York: Wiley.
10. Ashby, J, RW Tennant. (1991). Definitive relationships among chemical structure, carcinogenicity and mutagenicity for 301 chemicals tested by the US NTP. *Mutat. Res.* 257:229-306.
11. Ames, B.N. and Gold, L.S. (1999). The Prevention of Cancer. In: *Functional Foods for Disease Prevention I: Fruits, Vegetables, and Teas*, T. Shibamoto, J. Terao, and T. Osawa, eds. (Am. Chem. Soc., Washington, D.C.) 2-15
12. Helbock, H. J., Beckman, K B., and Ames, B. N. (1999) 8-Hydroxydeoxyguanosine and 8-Hydroxyguanine as Biomarkers of Oxidative DNA Damage. In *Oxidants and Antioxidants -Methods in Enzymology*, L. Packer, ed. (Acad. Press, San Diego, CA), vol. 300: 156-166.
13. Barrett, JC. (1993). Mechanisms of action of known human carcinogens. In *mechanisms of Carcinogenesis in Risk Identification*. Agencia Internacional para la Investigación sobre el Cáncer (IARC).
14. Stephanie J. Toering, Glenda J. Gentile and James M. Gentile. (1996) Mechanism of antimutagenic action of (+)-catechin against the plant-activated aromatic amine 4-nitro-o-phenylenediamine *Mutat. Res.* Vol. 361:81-87
15. Environmental Protection Agency (EPA). (1992). Guidelines for exposure assessment. *Fed. Reg.* 57:22888-22938.

16. Salamanca, F (1983) Desarrollo de la metodología citogenética contribuciones al conocimiento de la estructura cromosómica y sus aplicaciones en la clínica. *Gac. Med. México.* 119:315-316
17. Perry P. Wolf, S (1974) New Giemsa method for the diferencial staining of sister chromatides. *Nat.* 251:156-157.
18. Goto K.A. (1975) Simple diferencial Giemsa staining of sister chromatids after treatment with photosensitive dyes and exposure to light and the mechanisms of staining. *Chrom.* 53:223-230.
19. Latt, S.A. and Schreck, R. R. (1980) Sister chromatid exchange analysis. *Am. J. Hum. Genet.* 32:297–313.
20. Zuñiga-Gonzáles G. (2001) Sistema de detección de daño genético. *Genética Ambiental y Salud de Álvarez Moya C.* 2ª ed. Universidad de Guadalajara. México. 127-150.
21. W. Schmid, (1975)The micronucleus test. *Mutat. Res.* 31: 9-15.
22. J. A. Heddle, (1991) Micronuclei as an index of cytogenetic damage: past, present an future. *Environ. Mol. Mutagen.* 18:277-291.
23. P. Schmezer, (1990) Assay-specific genotoxicity of n-nitrosodibenzylamine to the rat liver in vivo. *Environ. Mol. Mutagen.* 15:190-197.
24. Lacy CF., Armstrong L., Morton G., Lance L. (2001-2002) *Drug Information Handbook.* 9o Ed. Am. Pharm. Assoc.
25. Jiménez V., Merino M., Almenar DJ., Cercós AC., Ferriols F., Merino V., Real JV. (2001) *Fármacos antineoplásicos y de soporte en el tratamiento del cáncer.* 1a Ed. Informática Médico Farmacéutica SL. Valencia.
26. Cheesman KH, Slater TF. (1998) An introduction to free radical biochemistry. *Br. Med. Bull.* 49:481-493.
27. Cheesman KH, Slater TF. (1998) Free Radicals in Medicine. *Br. Med. Bull.* 49:118-121.

28. Rahman I, Tomasi A. (2003) 2nd International Meeting on Free Radicals in Health and Disease. The role of oxidants and antioxidants in the regulation of chronic diseases. *Free. Radic. Res.* 37:349-354.
29. Cadenas E. (1997) Biochemistry of oxygen toxicity. *Annu. Rev. Biochem.* 58:79-110.
30. Nossal G.J.V., (1987) Currents concepts: inmunology. The basic components of the inmune system. *N. Engl. J. Med.* 316:1320-1325.
31. Abbas, J., Lichtman, G; Pober, R. (2003) *Inmunología celular y Molecular.* 5ª ed. McGraw-Hill Interamericana. México.
32. Roitt, I.M. y Delves, P.J. (2003) *Inmunología. Fundamentos.* 10ª ed. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires.
33. Janeway, C.A. Jr, Travers, P., Walport, M. y Shlomchik, M. *Inmunobiología.* (2003) *El sistema inmune en condiciones de salud y enfermedad.* Masson, 5ª ed. Barcelona.
34. Goldsby, R. A., Kindt, T. J., Osborne, B. A. y Kuby, J. Goldsby, R. (2004) *Inmunología.* 5ª ed. McGraw-Hill Interamericana, México.
35. Jiménez A. Bemondo H. (1990) *Primeros contactos con la flora americana.* 2ª ed. Ediciones Anaya. 1:5-125.
36. Alberto Castañeda, Ricardo. (1999) *Testimonios de vida de médicos indígenas tradicionales,* nº 3. INI. México D.F.
37. Roberts, M. F.; Wink, M. (1998) En: *Alkaloids. Biochemistry, ecology, and medicinal applications;* Roberts, M. F., Wink, M., Eds.; Plenum Press: New York and London. 1-7.
38. Goodman G.A., Hardman J.G., Limbird L.E. (1995) *Las bases farmacológicas de la terapéutica.* 9ª ed. Mc Graw Hill Interamericana II:1327-1386.
39. Philipson JD, Hemingway SR (1975) *Chromatographic and spectroscopic methods for the identification of alkaloids from herbarium samples of the genus uncaria.* *J Chromatogr.* 105:163-178.

40. Heitzman ME, Neto CC, Winiarz E. (2005) Ethnobotany, phytochemistry and pharmacology of *Uncaria* (Rubiaceae). *Phytochem.* 66 (1):5-29.
41. Matta SM, Monache FD, Ferrari F Marini (1976) Alkaloids and procyanidins of an *Uncaria* sp. From Peru. *Pharm. Sci.* 31:527-535.
42. Chapuis JC, Sordat B, Hostettman K (1998) Screening for cytotoxic activity of plants used in traditional medicine. *J Ethnopharmacol.* 23(2-3):273-284.
43. Senatore A, Cataldo A, Laccarino FP, Elberti MG (1989) Phytochemical and biological study of *Uncaria tomentosa*. *Boll. Soc. Ital. Biol. Sper.* 65:517-520
44. Rizzi R, Re F, Bianchi A, De Feo V, DeSimone F (1993) Mutagenic and antimutagenic activities of *uncaria tomentosa* and its extracts. *J Ethnopharmacol.* 38(1): 63-67.
45. Lemaire I, Assinewe V, Cano P, Awang DV, Arnason JT (1999) Stimulation of interleukin-1 and 6 production in alveolar macrophages by the neotropical liana, *Uncaria tomentosa*. *J. Ethnopharmacol.* 64:109-115.
46. Sheng Y, Oero RW, Amiri A, Bryngelson C (1998) Induction of apoptosis and inhibition of proliferation in human tumor cells treated with extracts of *uncaria tomentosa*. *Anticancer Res.* 18(5 A):3363-3368.
47. Salazar EL, Jayme V (1998) Depletion of specific binding sites for estrogen receptor by *Uncaria tomentosa*. *Proc. West. Pharmacol. Soc.* 41:123-124
48. Santa María A, López A, Diaz MM (1997) Evaluation of the toxicity of *uncaria tomentosa* by bioassays in vitro. *J Ethnopharmacol.* 57(3):183-187.
49. Heitzman ME, Neto CC, Winiarz E. (2005) Ethnobotany, phytochemistry and pharmacology of *Uncaria* (Rubiaceae). *Phytochem.* 66(1):5-29.
50. Riva L, Coradini D, Di Fronzo G. (2001) The antiproliferative effects of *Uncaria tomentosa* extracts and fractions on the growth of breast cancer cell line. *Anticancer Res.* 21(4A):2457-2461

51. Wurm M, Kacani L, Laus G. (1998) Pentacyclic oxindole alkaloids from *Uncaria tomentosa* induce human endothelial cells to release a lymphocyte-proliferation-regulating factor. *Plant. Med.* 64 (8):701-704
52. Tapiero H, Townsend DM, Tew KD (2003) Phytosterols in the prevention of human pathologies. *Biomed. Pharmacother.* 57:321–325
53. Ling WH, Jones PJ (1995) Dietary phytosterols: a review of metabolism, benefits and side effects. *Life Sci.* 57:195–206
54. Awad AB, von Holtz RL, Cone JP, Fink CS, Chen YC (1998) beta-Sitosterol inhibits the growth of HT-29 human colon cancer cells by activating the sphingomyelin cycle. *Anticancer Res.* 18:471–479
55. Awad AB, Fink CS (2000) Phytosterols as anticancer dietary components: evidence and mechanism of action. *J. Nutr.* 130:2127–2130
56. Gorinstein S, Martin-Belloso O, Katrich E, Lojek A, Ciz M, Gligelmo-Miguel N, Harnenkit R, Park YS, Jung ST, Trakhtenberg S (2003) Comparison of the contents of the main biochemical compounds and the antioxidant activity of some Spanish olive oils as determined by four different radical scavenging test. *J. Nutr. Biochem.* 14:154–159
57. Pegel KI (1997) The importance of sitosterol and sitosterolin in human and animal nutrition. *S. Afr. J. Sci.* 93:263–268
58. Bouic PJ (2001) The role of phytosterols and phytosterolins in immune modulation: a review of the past 10 years. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care.* 4:471–475
59. Lorke D. (1983) A new approach to practical acute toxicity testing. *Arch. Toxicol.* 54:275-287.
60. Wolff S, Perry P. (1974) Differential Giemsa staining of sister chromatids and the study of chromatid exchanges without autoradiography. *Chrom.* 48:341-53.
61. Townend, J (2002) *Practical statistics for environmental and biological scientists.* Wiley.

62. Alvarez-González I, Madrigal-Bujaidar E, Dorado V, Espinosa-Aguirre JJ. (2001) Inhibitory effect of naringin on the micronuclei induced by ifosfamide in mouse, and evaluation of its modulatory effect on the Cyp3a subfamily. *Mutat. Res.* 480:171-178.
63. Mc Kensie S (2000). *Hematología Clínica*, 2° Edición, Ed. Manual Moderno.
64. Gligelmo-Miguel N, Harnenkit R, Park YS, Jung ST, Trakhtenberg S (2003) Comparison of the contents of the main biochemical compounds and the antioxidant activity of some Spanish olive oils as determined by four different radical scavenging test. *J. Nutr. Biochem.* 14:154–159
65. Marruecos, L.; Nogue, S.; Nolla, J, (1993), *Toxicología Clínica*. Barcelona : Springer-Verlag Ibérica. 378 ISBN84-07-00112-0
66. Meyer, B. N. , N. R. Ferrigni , J. E. Putnam , L. B. Jacobsen , D. E. Nichols , and J. L. McLaughlin . (1982) Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. Volume 71 Issue 3. *J. of Med. Plant Res.* 45:31–34.
67. Lichfield JT, Wilcoxon F. (1949) A simplified method of evaluating dose- effect experiments. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 96:99-115.
68. Moreau, R. A., Whitaker, B. D. & Hicks, K. B. (2002) Phytosterols, phytostanols, and their conjugates in foods: structural diversity, quantitative analysis, and health-promoting uses. *Prog. Lipid. Res.* 41:457-500
69. Estrella, Eduardo (1995) *Plantas medicinales amazónicas: Realidad y perspectivas*. Lima, Tratado de Cooperación Amazónica, Secretaría Pro Tempore.
70. Kelly JP, Kaufman DW, Kelley K, Rosenberg L, Anderson TE, Mitchell AA. (2005) Recent trends in use of herbal and other natural products. *Arch. Intern. Med.* 165(3):281-286
71. Serrano Ruiz A, Cabrera García L, Saldaña Valderas M, Ruiz Antorán B, Avendaño Solá C. (2003) Riesgos de las plantas medicinales en uso

- concomitante con medicamentos. Información Terapéutica del Sistema Nacional de Salud. 27(6):161-167.
72. J. A. Heddle. (1983) The induction of micronuclei as a measure of genotoxicity. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. *Mutat. Res.*, 123:61-118.
73. MacGregor, J. T., Wehr, C. M., Henika, P. R., and Shelby, M. E. (1990) The in vivo Erythrocyte Micronucleus Test: Measurement at Steady State Increases Assay Efficiency and Permits Integration with Toxicity Studies. *Fund. Appl. Toxicol.* 14: 513-522.
74. Rappaport, S. M. (1993) Biological considerations in assessing exposures to genotoxic and carcinogenic agents. *Int. Arch. Occup. Environ. Health.* 65: S29-S35
75. Carrano, A. V. (1986) Chromosomal alterations as markers of exposure and effect. *J. Occup. Med.*, Vol. 28, (10):1112-1116
76. Richold, M., Chandly, A., Ashby, J., Gatehouse D. G., Bootman, J. and Henderson, L. (1990) In Vivo Cytogenetic Assays, in: D. J. Kirkland, (ed.), *Basic Mutagenicity Tests, UKEMS Recommended Procedures. UKEMS Subcommittee on Guidelines for Mutagenicity Testing Report. Part I revised*, Cambridge University Press, Cambridge, New Cork, Port Chester, Melbourne, Sydney.115-141.
77. Santa Maria A, Lopez A, Diaz MM, Alban J, Galan de Mera A, Vicente Orellana JA, Pozuelo JM. (1997) Evaluation of the toxicity of *Uncaria tomentosa* by bioassays in vitro. *J. Ethnopharmacol.* 57(3):183-187
78. Lee KK, Zhou BN, Kingston DGI, Vaisberg AJ, Hammond GB. (1999) Bioactive indole alkaloids from the bark of *Uncaria guianensis*. *Planta Med.* 65:759-760
79. Rizzi R, Re F, Bianchi A, De Feo V, DeSimone F (1993) Mutagenic and antimutagenic activities of *uncaria tomentosa* and its extracts. *J Ethnopharmacol.* 38(1): 63-67.

80. Goncalves C, Dinis T, Batista MT. (2005) Antioxidant properties of proanthocyanidins of *Uncaria tomentosa* bark decoction: a mechanism for anti-inflammatory activity. *Laboratorio de Farmacognosia, Faculdade de Farmacia and Centro de Estudos Farmaceuticos, Universidade de Coimbra, Portugal. Phytochem.* 66(1):89-98.
81. Dariusz Bednarek, Jerzy Lukasiak, Marian Kondracki, Katarzyna Zurowska, Bogdan Falkiewicz, and Krzysztof Niemczuk. (2004) Analysis of phenotype and functions of peripheral blood leukocytes in cellular immunity of calves treated with *uncaria tomentosa*. *Bull. Vet. Inst. Pulawy.* 48:289-296,
82. Wurm M, Kacani L, Laus G. (1998) Pentacyclic oxindole alkaloids from *Uncaria tomentosa* induce human endothelial cells to release a lymphocyte proliferation regulating factor. *Planta Med.* 64:701-704.
83. Keplinger K, Laus G, Wurm M, Dierich MP, Teppner H (1999) *Uncaria tomentosa* (Willd.) DC.—ethnomedicinal use and new pharmacological, toxicological and botanical results. *J. Ethnopharmacol.* 64:23–34
84. Sheng Y, Bryngelsson C, Pero RW. (2000) Enhanced DNA repair, immune function and reduced toxicity of C-MED-100, a novel aqueous extract from *Uncaria tomentosa*. *J. Ethnopharmacol.* 69(2):115-126
85. Kassen A, Berges R, Senge T (2000) Effect of beta-sitosterol on transforming growth factor-beta-1 expression and translocation protein kinase C alpha in human prostate stromal cells in vitro. *Eur. Urol.* 37:735–741
86. Berges RR, Windeler J, Trampisch HJ, Senge T (1995) Randomised, placebo-controlled, double-blind clinical trial of beta-sitosterol in patients with benign prostatic hyperplasia. Beta-sitosterol Study Group. *Lancet.* 345:1529–1532.
87. Klippel KF, Hiltl DM, Schipp B (1997) A multicentric, placebocontrolled, double-blind clinical trial of beta-sitosterol (phytosterol) for the treatment of benign prostatic hyperplasia. German BPH-Phyto Study group. *Br. J. Urol.* 80:427–432

88. Berges RR, Kassen A, Senge T (2000) Treatment of symptomatic benign prostatic hyperplasia with beta-sitosterol: an 18-month follow-up. *BJU Int.* 85:842–846
89. Awad AB, Fink CS (2000) Phytosterols as anticancer dietary components: evidence and mechanism of action. *J. Nutr.* 130:2127–2130.
90. Landa MC, Frago N, Tres A. (1994) Diet and the risk of breast cancer in Spain. *Eur. J. Cancer. Prev.* 3:313-20.
91. Keplinger, K. (1982) Cytostatic, contraceptive, and antiinflammatory agents from *Uncaria tomentosa*. *PTC Int. Appl. WO 82 01 130*, Austria.
92. Senatore A, Cataldo A, Iaccarino FP, Elberti MG. (1989) Phytochemical and biological study of *Uncaria tomentosa*. *Boll. – Soc. It. Biol. Sperim.* 65:517-20.
93. Aquino R, De Feo V, De Simone F, (1991) Plant metabolites. New compounds and anti-inflammatory activity of *Uncaria tomentosa*. *J. Nat. Prod.* 54(2):453-459
94. De Flora S (1998) Mechanisms of inhibitors of mutagenesis and carcinogenesis. *Mutat. Res.* 402:151-158.
95. Aguilar JL, Rojas P, Marcelo A, Plaza A, Bauer R, Reiningger E, Klaas CA, Merfort I (2002) Anti-inflammatory activity of two different extracts of *Uncaria tomentosa* (Rubiaceae). *J. Ethnopharmacol.* 81:271–276
96. Hayatsu, H., Arimoto, S., y Negishi, T. (1988) Dietary inhibitors of mutagenesis and carcinogenesis. *Mutat. Res.* 202: 429-446.
97. Sasaki Y, Sakaguchi M, Yamagishi T, Yamada H and Shirasu Y (1994) Bio-anticlastogenic effects of unsaturated fatty acids included in fish oil- docosahexaenoic acid, docosapentaenoic acid, and eicosapentaenoic acid- in cultured Chinese hamster cells. *Mutat. Res.* 320:9-22.