



**“ESTUDIO
ANTIGENOTOXICOLÓGICO Y
DE CITOTÓXICIDAD
DE PLANTAS MEDICINALES DE USO
COTIDIANO
Y DE SUS FENOLES MÁS CARACTERÍSTICOS”**



**UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA
Departamento de Genética**

**Tesis Doctoral
2013**

Magdalena Romero Jiménez

TITULO: *ESTUDIO ANTIGENOTOXICOLÓGICO Y DE CITOTOXICIDAD DE
PLANTAS MEDICINALES DE USO COTIDIANO Y DE SUS FENOLES
MÁS CARACTERÍSTICOS.*

AUTOR: *MAGDALENA ROMERO JIMENEZ*

© Edita: Servicio de Publicaciones de la Universidad de Córdoba.
Campus de Rabanales
Ctra. Nacional IV, Km. 396 A
14071 Córdoba

www.uco.es/publicaciones
publicaciones@uco.es



UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA

TESIS DOCTORAL

ESTUDIO ANTIGENOTOXICOLÓGICO Y DE CITOTOXICIDAD DE PLANTAS
MEDICINALES DE USO COTIDIANO Y DE SUS FENOLES MÁS
CARACTERÍSTICOS

Trabajo realizado en el Departamento de Genética de la Universidad de Córdoba para optar al grado de Doctor en Biociencias y Ciencias Agroalimentarias.

Magdalena Romero Jiménez

Dirigido por:

Dra. Ángeles Alonso Moraga

Dr. Andrés Muñoz Serrano

Córdoba, Enero de 2013



TÍTULO DE LA TESIS:

ESTUDIO ANTIGENOTOXICOLÓGICO Y DE CITOTOXICIDAD DE PLANTAS MEDICINALES DE USO COTIDIANO Y DE SUS FENOLES MÁS CARACTERÍSTICOS.

DOCTORANDO/A: MAGDALENA ROMERO JIMÉNEZ.

INFORME RAZONADO DEL/DE LOS DIRECTOR/ES DE LA TESIS

La Tesis Doctoral realizada y presentada por Magdalena Romero Jiménez se ha llevado a cabo en el Departamento de Genética de la Universidad de Córdoba. Su desarrollo ha permitido a la doctoranda adquirir una sólida formación en diversas disciplinas de la Genética aplicándolas de un modo transversal. Durante la realización de la Tesis, Dña. Magdalena Romero Jiménez ha confirmado una excelente aptitud y vocación por la investigación científica y ha demostrado poseer una excelente capacidad de trabajo, organización e integración así como de redacción de trabajos científicos.

El trabajo realizado por Dña. Magdalena Romero Jiménez ha permitido otorgar un valor añadido a plantas medicinales de uso tradicional mundial como *Matricaria chamomilla*, *Uncaria tomentosa*, *Mentha piperita*, *Mentha pulegium*, *Tilia cordata* y *Valeriana officinalis*, asignando papeles importantes en la lucha contra procesos degenerativos a estas plantas que están incluidas en la dieta mundial.

Por todo ello, se autoriza la presentación de la tesis doctoral.

Córdoba, 3 de Enero de 2013

Firma del/de los director/es

Fdo.: Ángeles Alonso Moraga

Fdo.: Andrés Muñoz Serrano



Agradecimientos

En primer lugar, quiero agradecer a Angelines y a Andrés la oportunidad que me brindaron de trabajar en su línea de investigación; del mismo modo les agradezco las atenciones y la paciencia que han tenido conmigo, la amistad que me han ofrecido y su inestimable ayuda. Gracias a los dos por estos años compartidos. Me llevo un gran número de enseñanzas tanto personales como profesionales. Os llevaré en mis recuerdos porque habéis formado parte de mi vida y de mis inicios profesionales.

En mis "ir y venir" de este laboratorio he coincidido con muchísimos compañeros, de los cuales me llevo tantos recuerdos. De todos he aprendido y a todos les guardo mucho cariño, y con gran parte de ellos conservo una bonita amistad. Es tan fácil trabajar con vosotros. Gracias.

Gracias a mis compañeros del Departamento de Fisiología. Gracias a Leonor y Manolo, por darme la oportunidad de aprender a su lado y hacerme competitiva en este difícil mundo de la investigación, y por dejarme formar parte de su grupo de personas de los que he aprendido tanto.

En esta última etapa de escritura de Tesis, quizás la más grata y quizás también la más tediosa, he compartido muchas horas con mí querida Marisol. Juntas hemos vivido una etapa terrible en la cual nos hemos apoyado y hemos intentando seguir adelante, dejando de lado en muchos momentos nuestro sentimiento de pérdida, para poder terminar nuestras Tesis. Muchas Gracias Marisol. A Tania, quisiera agradecerle su buen humor que ha hecho el día a día menos triste. Lo has hecho todo mucho más fácil por tu iniciativa y tu manera de ser tan resolutiva. Es un placer trabajar contigo. Mil Gracias.

Muy especialmente, a mis padres, que han sido mi principal apoyo; me han dado el cariño y el aliento necesario para que esté este trabajo hoy terminado. A ellos mi más sincero agradecimiento; siempre me animaron a superarme como persona, confiaron en mis cualidades profesionales y me dejaron tomar mis propias decisiones y aprender de mis errores. A mi madre, de ella he aprendido a luchar por lo que quiero y la paciencia para conseguirlo.

A mis hermanos, que se sacrificaron para que yo pudiera volcarme en este trabajo, me ayudaron en todo lo posible, sin preguntas, y me ofrecieron su apoyo siempre. Mucho de este trabajo es vuestro.



No existen palabras con las que expresar el agradecimiento que siento hacia mis amigas, Tina, Desirée y Sonia, por confiar en mi capacidad cuando yo dudé de tenerla y por tenderme siempre la mano, no dejándome ni tocar el suelo. Gracias a mi prima Mariló, que para mí ha sido una hermana; en todo momento ha estado para escucharme, animarme y darme su apoyo. Gracias a Rosa, que más que una cuñada ha sido una amiga en momentos difíciles de mi vida, gracias por ser mi parte racional con tus sabios consejo; y por darme a mi sobrino Sergio, lo quiero desde el minuto uno de su vida, y me da un motivo siempre para sonreír.

Espero no olvidarme de nadie, este trabajo va por todos vosotros que con vuestro cariño, en algún momento habéis pasado por mi vida en estos años, influyendo de algún modo en ella. Recordaré esta etapa con mucho cariño.

No quisiera olvidarme de expresar mi más sincero agradecimiento a todas las personas y organismos, que de una u otra manera, me han ayudado a la realización de esta Tesis.

Gracias a todos vosotros.



Abreviaturas

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
<i>Bd^f</i>	Marcador genético <i>Beaded-Serrate</i> (3-91.9)
C.E.E.	Comunidad Económica Europea
cél.	Células
CI50	Concentración Inhibitoria 50
DDT	1,1,1-tricloro-2,3-bis (4-clorofenil) etano
DHBA	Ác. Protocatecuico o 3,4 Dihidroxibenzoico
DL50	Dosis letal 50%
<i>Dp(1;3) sc¹⁴</i>	Duplicación (1;3) <i>scute</i>
DU-145	Células de cáncer de próstata
ERNs	Especies Reactivas de Nitrógeno.
EROs	Especies Reactivas de Oxígeno
<i>flr</i>	Marcador genético <i>flare</i> (3-38.8)
frec.	Frecuencia
G1/S	Progresión del ciclo celular fase G1 a S
GSTs	Glutatió-S-transferasas.
In (L)	Inversión cromosómica del brazo izquierdo
In (R)	Inversión cromosómica del brazo derecho
<i>ju</i>	Marcador genético <i>javeli</i> (3-19.2)
<i>Mé</i>	Marcador genético <i>Moiré</i> (3-19.2)
<i>mwh</i>	Marcador genético <i>multiple wing hairs</i> (3-0.3)
NORR	Nueva cepa Oregón resistente al DDT
NTP	Programa Nacional de Toxicología
ORR	Cepa Oregón resistente al DDT
P450	Sistema enzimático de monooxigenasas dependientes del citocromo P-450
P38	Proteína quinasa activada por mitógeno
P53	Proteína supresora de tumores
<i>ply</i>	<i>paisley</i>
PZ-HPV-7	Células epiteliales normales de próstata
<i>ri</i>	Marcador genético <i>radius incompletus</i> (3-47.0)
<i>sbd²</i>	Marcador genético <i>stubbleoid</i> (3-58.2)
<i>Ser</i>	<i>Serrate</i>
S.M.A.R.T	Somatic Mutation And Recombination Test (Ensayo de mutación y recombinación somáticas)
t-BHP	Tert-butilhidroperóxido
<i>TM1 = In</i>	
<i>(3LR)TM1</i>	Inversión múltiple cromosoma 3
<i>TM3 = In (3LR)</i>	
<i>TM3</i>	Inversión múltiple cromosoma 3
<i>w</i>	Marcador genético <i>white</i> (1-1.5)
<i>y</i>	Marcador genético <i>yellow</i> (1-0.0)



 Índice

Abreviaturas	
Abstract	5
Resumen	7
1. Introducción	11
1.1. Cáncer y Dieta	12
1.2. Transformación metabólica de los xenobióticos	18
1.3. Estrés oxidativo	19
1.4. Ensayos de genotoxicidad	22
1.4.1. Antimutágenos y anticarcinógenos	25
1.5. Ensayo de mutación y recombinación somáticas (S.M.A.R.T.) en alas de <i>D. melanogaster</i>	26
1.6. Ensayo de citotoxicidad	31
1.7. Medicina Tradicional	34
1.7.1. Propiedades no saludables de las plantas medicinales	35
1.7.2. Propiedades saludables de las plantas medicinales	36
1.8. Plantas medicinales a estudio	37
1.8.1. Bioactividad de las plantas medicinales a estudio	43
1.9. Fenoles contenidos en las Plantas	46
1.9.1. Fenoles representativos de las plantas medicinales estudiadas	48
1.9.2. Actividad genotóxica, antigenotóxica y citotóxica de los fenoles a estudio	51
1.10. Objetivo del presente trabajo	55
2. Materiales y Métodos	59
2.1. Ensayos en Sistema <i>in vivo</i> de evaluación del daño genético	59
2.1.1. Estirpes utilizadas	61
2.1.2. Mantenimiento de las estirpes	64
2.1.3. Manejo de los adultos	64
2.1.4. Obtención de hembras vírgenes	64
2.1.5. Realización de los cruces	65
2.1.6. Puesta de huevos	66
2.1.7. Recolección de las larvas	66
2.1.8. Sustancias analizadas	67
2.1.8.1. Plantas Medicinales: Infusiones	67
2.1.8.2. Sustancias simples	67
2.1.9. Tratamientos	68
2.1.10. Preparación de las alas	72
2.1.11. Análisis microscópico de las alas	73
2.1.12. Inhibición de la genotoxicidad	78
2.1.13. Tratamiento estadístico	78
2.1.13.1. Comparación entre repeticiones	78
2.1.13.2. Comparación entre series tratadas y controles	79
Test binomial condicional	81



Test χ^2 para proporciones	82
2.1.13.3. Frecuencia de inducción de clones	83
2.2. Ensayos de Citotoxicidad	83
2.2.1. Mantenimiento de las células	84
2.2.1.1. Medio de Cultivo	84
2.2.1.2. Cultivo celular	84
2.2.2. Sustancias analizadas	85
2.2.2.1. Plantas secas liofilizadas	85
2.2.2.2. Infusiones liofilizadas	85
2.2.2.3. Fenoles componentes de las plantas	86
2.2.3. Tratamientos	86
2.2.3.1. Preparación de las Plantas secas liofilizadas	86
2.2.3.2. Preparación de las Infusiones liofilizadas	87
2.2.3.3. Preparación de las Soluciones de los Fenoles	87
2.2.3. Recuento celular	87
2.2.5. Citotoxicidad	88
Tratamiento estadístico	88
3. Resultados y Discusión	91
3.1. Modelo SMART	91
3.1.1. Análisis de los controles y de los cruces seleccionados	91
3.1.1.1. Análisis de los controles negativos	92
3.1.1.2. Análisis de los controles positivos	94
3.1.1.2.1. <i>Etil carbamato</i>	94
3.1.1.2.2. <i>Peróxido de Hidrógeno</i>	96
3.1.1.3. Selección de los cruces Estándar versus NORR para los ensayos de Genotoxicidad y Antigenotoxicidad	102
3.1.2. Estudio de las Infusiones de las Plantas medicinales seleccionadas	103
3.1.2.1. Plantas con actividad antiinflamatoria: <i>M. chamomilla-U. tomentosa</i>	104
3.1.2.1.1. <i>Resultados de Toxicidad</i>	104
3.1.2.1.2. <i>Resultados de Genotoxicidad-Antigenotoxicidad de M. chamomilla y U. tomentosa frente al Peróxido de Hidrógeno</i>	105
3.1.2.2. Plantas con actividad digestiva: <i>M. piperita-M. pulegium</i>	109
3.1.2.2.1. <i>Resultados de Toxicidad</i>	109
3.1.2.2.2. <i>Resultados de Genotoxicidad-Antigenotoxicidad de M. piperita y M. pulegium frente al Peróxido de Hidrógeno</i>	110
3.1.2.3. Plantas con actividad sedante: <i>T. cordata-V. officinalis</i>	113
3.1.2.3.1. <i>Resultados de Toxicidad</i>	113
3.1.2.3.2. <i>Resultados de Genotoxicidad-Antigenotoxicidad de T. cordata y V. officinalis frente al Peróxido de Hidrógeno</i>	114
3.1.3. Estudio de los Fenoles de las Plantas medicinales seleccionadas	118
3.1.3.1. Fenoles de Plantas con actividad antiinflamatoria (<i>M. chamomilla-U. tomentosa</i>): <i>Bisabolol-Apigenina-Ac. Protocatecuico</i>	119
3.1.3.1.1. <i>Resultados de Toxicidad</i>	119



3.1.3.1.2. Resultados de Genotoxicidad-Antigenotoxicidad de los Fenoles de las plantas medicinales antiinflamatorias seleccionadas frente al mutágeno -----	121
3.1.3.2. Fenoles de Plantas con actividad digestiva (<i>M. piperita</i> - <i>M. pulegium</i>): <i>Mentol-Pulegona</i> -----	128
3.1.3.2.1. Resultados de Toxicidad-----	128
3.1.3.2.2. Resultados de Genotoxicidad-Antigenotoxicidad de los Fenoles de las plantas medicinales digestivas seleccionadas frente al mutágeno -----	129
3.1.3.3. Fenoles de Plantas con actividad sedante (<i>T. cordata</i> - <i>V. officinalis</i>): Quercitina-Limoneno-Ac. Valerénico -----	132
3.1.3.3.1. Resultados de Toxicidad-----	132
3.1.3.3.2. Resultados de Genotoxicidad-Antigenotoxicidad de los Fenoles de las plantas medicinales sedantes seleccionadas frente al mutágeno -----	135
3.2. Modelo de Citotoxicidad -----	138
3.2.1. Análisis de los controles de Citotoxicidad -----	138
3.2.2. Estudio de las Infusiones de las Plantas Medicinales seleccionadas-----	141
3.2.2.1. Plantas con actividad antiinflamatoria: <i>M. chamomilla</i> - <i>U. tomentosa</i> -----	142
3.2.2.2. Plantas con actividad digestiva: <i>M. piperita</i> - <i>M. pulegium</i> -----	145
3.2.2.3. Plantas con actividad sedante: <i>T. cordata</i> - <i>V. officinalis</i> -----	147
3.2.3. Estudio de los Fenoles de las Plantas Medicinales seleccionadas-----	148
3.2.3.1. Fenoles de Plantas con actividad antiinflamatoria (<i>M. chamomilla</i> y <i>U. tomentosa</i>): <i>Bisabolol</i> - <i>Apigenina</i> - <i>DHBA</i> -----	148
3.2.3.2. Fenoles de Plantas con actividad digestiva (<i>M. piperita</i> y <i>M. pulegium</i>): <i>Mentol-Pulegona</i> -----	151
3.2.3.3. Fenoles de Plantas sedante (<i>T. cordata</i> y <i>V. officinalis</i>): <i>Quercitina-Limoneno-Ác. Valerénico</i> -----	152
3.3. Estudio de la correlación de los resultados obtenidos -----	155
4. Conclusiones -----	165
5. Bibliografía -----	169





To give an answer to the growing interest of consumers about the beneficial effects on their health of herbal preparations that are usually taken without medical prescription, we have selected a group of medicinal plants of daily use and phenols contained in them to study certain indicators of its possible bioactivity.

Three types of plants have been selected: anti-inflammatory (*Matricaria chamomilla* and *Uncaria tomentosa*), digestives (*Mentha piperita* and *Mentha pulegium*) and sedatives (*Tilia cordata* and *Valeriana officinalis*); and the phenols contained in them: *Bisabolol*, *Apigenin*, *Protocatechuic Acid*, *Menthol*, *Pulegone*, *Quercetin*, *Limonene* and *Valerenic Acid*. The selected markers of bioactivity have been: (i) toxicity (being tested in the eukaryotic model *Drosophila melanogaster*), (ii) genotoxicity or genomic safety (tested in the *in vivo* model of somatic mutations and recombinations of *D. melanogaster*, S.M.A.R.T.), (iii) antigenotoxicity or protection against the genetic damage caused by oxidants agents (tested in the *in vivo* somatic mutations and recombinations of *D. melanogaster* model) and (iv) cytotoxicity or chemopreventive potential (tested in the tumor growth inhibition *in vitro* model of HL60 human leukemia cells).

All plants and tested molecules have proved to be toxic to *D. melanogaster*, although in different extent, in increasing order: *V. officinalis*, *Valerenic Ac.*, *Bisabolol*, *Limonene*, *Quercetin*, *DHBA*, *Menthol*, *T. cordata*, *Pulegone*, *M. chamomilla*, *Apigenin*, *U. tomentosa*, *M. pulegium*, and *M. piperita*. In general, Tila and Valerian sedative plants as well as their components studied molecules were the less toxic; and the digestive mints, the more toxic.

No plant or molecule has been genotoxic in the Somatic Mutation and Recombination Test of *D. melanogaster*, so they all are safe. Although some substances show high rates of clone induction, like *U. tomentosa* and *M. chamomilla*; being others even below the negative control, like the *Bisabolol* and *Apigenin*.

All plants and molecules, with the exception the *Pulegone*, have shown protective activity of the genome against hydrogen peroxide-induced oxidative damage. The most powerful are the infusions of plants, exerting the individual molecules medium or low inhibition rates. This phenomenon suggests the existence of epigenetic interactions that can occur between highly oxidants endogenous elements (hydrogen peroxide) and highly antioxidants elements (phenols) acting together on the plant.



All plants and molecules have been able of inhibiting the growth of the HL60 human promyelocytic cell line, although the *Valerenic Ac.* only reaches to inhibit 20%. *Tila*, *Valerian*, and cat's claw are less powerful plants, being Mints and Chamomile the more cytotoxic. The more effective Phenols against leukemia cells are *Apigenin*, *Quercetin*, *DHBA* and *Bisabolol*.

In this work we have provided a new body of data on its safety in the use and protector and chemopreventive potential of simple and complex substances of botanical origin. Based on our results and concordances with other genotoxicity assays, antigenotoxicity and cytotoxicity, we suggest: to study new indicators of bioactivity to propose in the future the substances of better behavior as nutraceuticals (*U. tomentosa*, *M. piperita*, *M. pulegium*, *T. cordata*, *Bisabolol* and *Menthol*); to confirm our results that *Quercetin* and *Limonene* are chemopreventive and have no carcinogenic activity by performing further tests in human models; to confirm our results for *Valerian* and *Valerenic Acid* through other test; and to eliminate the *Pulegone* as a possible healthy substance.



Para dar respuesta al creciente interés de los consumidores sobre los efectos beneficiosos en su salud de preparados herbales que se suelen tomar sin prescripción médica, hemos seleccionado un grupo de plantas medicinales de uso cotidiano y fenoles contenidos en ellas para estudiar ciertos indicadores de su posible bioactividad.

Las plantas seleccionadas ha sido de tres tipos: antiinflamatorias (*Matricaria chamomilla* y *Uncaria tomentosa*), digestivas (*Mentha piperita* y *Mentha pulegium*) y sedantes (*Tilia cordata* y *Valeriana officinalis*); y los fenoles contenidos en ellas: *Bisabolol*, *Apigenina*, *Ácido Protocatecuico*, *Mentol*, *Pulegona*, *Quercitina*, *Limoneno* y *Ácido Valerénico*. Los marcadores de bioactividad seleccionados han sido: (i) toxicidad (ensayada en el modelo eucariota *Drosophila melanogaster*), (ii) genotoxicidad o seguridad genómica (ensayada en el modelo *in vivo* de Mutaciones y Recombinaciones Somáticas de *D. melanogaster*, S.M.A.R.T.), (iii) antigenotoxicidad o protección frente al daño genético causado por agentes oxidantes (ensayada en el modelo *in vivo* de Mutaciones y Recombinaciones Somáticas de *D. melanogaster*) y (iv) citotoxicidad o potencial quimiopreventivo (ensayada en el modelo de inhibición del crecimiento tumoral *in vitro* de células HL60 de leucemia humana).

Todas las plantas y moléculas ensayadas han resultado tóxicas para *D. melanogaster*, aunque a distintas intensidades, que son en orden creciente: *V. officinalis*, *Ác. Valerénico*, *Bisabolol*, *Limoneno*, *Quercitina*, *DHBA*, *Mentol*, *T. cordata*, *Pulegona*, *M. chamomilla*, *Apigenina*, *U. tomentosa*, *M. pulegium*, y *M. piperita*. Destacamos en general, las plantas sedantes Tila y Valeriana así como sus componentes estudiados, los menos tóxicos y las digestivas Mentas, las más tóxicas.

Ninguna planta ni molécula ha resultado genotóxica en el ensayo de Mutaciones y Recombinaciones Somáticas de *D. melanogaster*, por lo que todas son seguras. Aunque algunas sustancias muestran tasas de inducción de clones altas, como *U. tomentosa* y *M. chamomilla*; las de otras están incluso por debajo del control negativo, como el *Bisabolol* y la *Apigenina*.

Todas las plantas y moléculas, excepto la *Pulegona*, han mostrado actividad protectora del genoma frente al daño oxidativo provocado por el Peróxido de Hidrógeno. Las más potentes son las infusiones de las plantas, ejerciendo las moléculas individuales inhibiciones medias o bajas. Este fenómeno sugiere la existencia de interacciones epigenéticas que pueden darse entre elementos endógenos altamente oxidantes (Peróxido de Hidrógeno) y elementos altamente antioxidantes (fenoles) actuando conjuntamente en la planta.



Todas las plantas y moléculas han sido capaces de inhibir el crecimiento de la línea celular promielocítica humana HL-60, aunque el *Ác. Valerénico* sólo alcanza a inhibir el 20%. Tila, Valeriana y *Uncaria tomentosa* son las plantas menos potentes, siendo las más citotóxicas las Mentas y la Manzanilla. Los fenoles más eficaces frente a las células de leucemia son *Apigenina*, *Quercitina*, *DHBA* y *Bisabolol*.

En este trabajo hemos aportado un nuevo cuerpo de datos sobre su seguridad en el uso y el potencial protector y quimiopreventivo de sustancias simples y complejas de origen botánico. Teniendo en cuenta nuestros resultados y las concordancias con otros ensayos de genotoxicidad, antigenotoxicidad y citotoxicidad sugerimos: estudiar nuevos indicadores de bioactividad para proponer en un futuro a las sustancias de mejor comportamiento como nutracéuticos (*U. tomentosa*, *M. piperita*, *M. pulegium*, *T. cordata*, *Bisabolol* y *Mentol*); confirmar nuestros resultados de que *Quercitina* y *Limoneno* son quimiopreventivos y no tienen actividad carcinogénica realizando nuevos ensayos en modelos humanos; confirmar nuestros resultados para *Valeriana* y *Ác. Valerénico* mediante otros ensayos; y eliminar la *Pulegona* como posible sustancia saludable.

INTRODUCCIÓN





1. Introducción

El interés de los consumidores por tener un papel activo en el mantenimiento de la salud se ha visto incrementado en la última década. Esto ha originado una gran profusión de productos en el mercado que contienen ingredientes de la dieta que pretenden producir efectos positivos en su salud. Estos ingredientes están incluidos en los productos alimenticios y se venden bien como suplementos dietéticos y alimentos funcionales o como nutraceuticos. Al no existir una regulación distinta para los alimentos funcionales o nutraceuticos, éstos se regulan simplemente como alimentos. Un alimento funcional es aquel que abarca productos potencialmente saludables, incluyendo cualquier alimento modificado o ingrediente alimenticio que pueda proporcionar un beneficio para la salud junto con el que tradicionalmente contiene el nutriente (Thomas y Earl, 1994). Los alimentos funcionales también son conocidos como nutraceuticos y pueden ser definidos según De Felice (1996) como alimentos o parte de ellos que proporcionan beneficios médicos incluyendo la prevención y/o tratamiento de enfermedades. Tales productos pueden variar en un amplio rango y ser nutrientes aislados, suplementos de la dieta, alimentos procesados o productos herbales (plantas medicinales). Muchos de los compuestos bioactivos de las plantas (metabolitos primarios y secundarios) como ácidos grasos poliinsaturados, carotenoides, vitaminas, esteroides, terpenos, polisacáridos, glucósidos y compuestos fenólicos, muestran una potente actividad antioxidante, antimicrobiana, antiinflamatoria y antitumoral y por lo tanto representan compuestos clave en la prevención de diversas enfermedades como son cáncer, inflamación crónica, enfermedad cardiovascular y procesos de envejecimiento (Ksouri et al, 2012).

Sin embargo, podemos hacer una distinción entre alimentos funcionales en general y nutraceuticos. Los nutraceuticos servirían para prevenir la enfermedad y tratarla, así como podrían o no estar en la dieta cotidiana, mientras que los alimentos funcionales sólo reducirían la enfermedad y estarían en la dieta ordinaria. En realidad, desde hace siglos se han usado plantas encontradas en la naturaleza para curar dolencias y enfermedades. De este cuerpo de datos ha surgido la Nutraceutica, una nueva ciencia que trata sobre el uso de los componentes de plantas naturales para la curación de enfermedades y paliar dolencias, que se aíslan, y su droga se usa en la industria farmacéutica. (Gupta et al., 2010; Ahmad, et al. 2011).

Actualmente existe un vasto vocabulario que contiene términos relativos a alimentos o elementos de la dieta que posean alguna característica saludable: los alimentos funcionales, alimentos medicinales (alimentos para usos dietéticos especiales que son especialmente procesados o formulados para usarse en dietas de pacientes bajo supervisión médica),



suplementos de la dieta, alimentos para usos dietéticos especiales (no son consumidos normalmente como alimentos) y alimentos fortificados o enriquecidos (alimentos con nutrientes esenciales adicionados para corregir o prevenir deficiencias nutricionales en una población o grupo específico poblacional). Según Kwak y Jukes (2001) todos estos términos, a veces no muy claros, tampoco son mutuamente excluyentes, de modo que se solaparían según el gráfico que se indica a continuación (figura 1.1.).

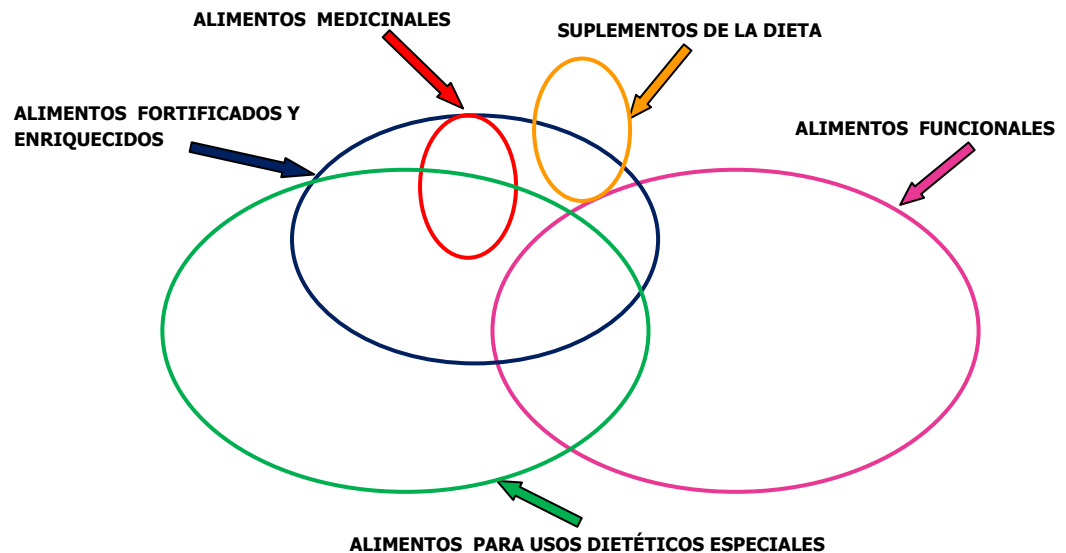


Figura 1.1. Gráfico de solapamiento de usos de alimentos. Tomado de Kwak y Jukes (2001).

Las plantas medicinales pueden estar incluidas en varios de estos grupos o en sus intersecciones, dependiendo del uso que se les dé tradicionalmente o de la revisión actual que de ellas se viene haciendo en los últimos años.

1.1. Cáncer y Dieta

El cáncer es la segunda causa más común de muerte en el mundo industrializado, después de las enfermedades cardiovasculares. El campo de opciones disponibles de tratamientos efectivos para pacientes con cáncer ha mejorado constantemente en las décadas recientes (Winqvist et al., 2009), junto con las mejoras tecnológicas para el diagnóstico precoz y la prevención de determinados tipos de cáncer. Esto es particularmente cierto en el caso de leucemia aguda en niños y otros linfomas, cáncer testicular y sarcoma de osteocitos. Un



creciente número de enfermos que sufren otras formas de cáncer tales como cáncer de pecho, de colon, uterino y de próstata, están beneficiándose también de tratamientos exitosos. Para pacientes con cáncer sin curación por terapias actuales, el mayor objetivo es mejorar su calidad de vida. Muchas de las terapias paliativas y de prevención incluyen el uso de plantas y alimentos que pueden incrementar la inmunidad y tener propiedades anticarcinogénicas.

Es inevitable la exposición de los tejidos a ciertos agentes tóxicos endógenos; aunque en circunstancias normales, las células tienen mecanismos adecuados para reducir la carga genotóxica impuesta por estos agentes a unos niveles insignificantes. Una inflamación persistente eleva el riesgo de cáncer lo suficiente como para que se tome en consideración en estudios de control epidemiológico. Los avances actuales en el conocimiento de los supresores de tumores y de los mediadores inflamatorios ofrecen una buena oportunidad para orientar las investigaciones sobre inflamación mediante modelos moleculares y celulares. Sin embargo, no todos los resultados obtenidos en los trabajos realizados utilizando antioxidantes frente a los agentes endógenos que producen un alto riesgo (como el Peróxido de Hidrógeno y especies reactivas de oxígeno, en general) son concluyentes. Más bien, nos lleva a una hipótesis alternativa en la que la integridad genómica estaría modulada por la inactivación epigenética de supresores de tumores claves tales como el P⁵³ (Heyn y Esteller, 2012).

Localizada la inflamación crónica, aparece un incremento del riesgo de cáncer en varios órganos, incluyendo pulmones, páncreas, esófago y piel. Un estudio que involucra 78.000 pacientes con asma, muestra un significativo riesgo de cáncer tanto en hombres como mujeres, consistente en una inflamación crónica local (Huovinen et al., 1997). Existe una clara asociación entre inflamación persistente y determinados tipos de cáncer, Fitzpatrick (2001) describe cómo una inflamación epitelial del ovario, una cistitis eosinofílica o una pancreatitis pueden aumentar el riesgo de padecer un cáncer de ovario, de vejiga o de páncreas respectivamente; o como una sarcoidosis aumenta el riesgo de cáncer de pulmón, hígado y piel.

Una inflamación persistente aumenta el riesgo de cáncer fundamentalmente dentro del órgano involucrado pero no en órganos distales. Esto es posible porque durante el mecanismo normal de defensa, los granulocitos secretan químicamente radicales reactivos y mediadores electrofílicos. La inflamación expone el epitelio proximal y células del estroma a sustancias potencialmente mutagénicas. Por tanto, la actividad neutrófila puede transformar líneas celulares en variantes con rasgos neoplásicos. Granulocitos y linfocitos generan por lo menos cuatro tipos diferentes de productos que son genotóxicos o mutagénicos: Peróxido de



Hidrógeno y radicales oxi, Oxido nítrico, Malondialdehido y 4-Hidroxi-2-nonenal. Los dos últimos desempeñan un papel en la peroxidación lipídica. Los radicales oxi derivados del Peróxido de Hidrógeno actúan directamente, causando rupturas en el DNA que introducen mutaciones oncogénicas, o indirectamente modulando la transcripción génica, y la supresión genómica de reparación de daños. Las especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno se relacionan con un riesgo elevado de aparición de cánceres asociados a inflamación persistente (Fitzpatrick, 2001).

Entendemos por dieta el conjunto de alimentos, tanto sólidos como líquidos, que componen la alimentación nutricional de una persona o grupo de personas. Si bien, nuestra dieta esta complementada con un gran número de sustancias aditivas, bebidas y otros complementos nutricionales que tomamos de forma esporádica por tradición o costumbres culturales.

Es escaso el conocimiento que se tiene sobre la dieta originaria de la especie humana; no obstante, descubrimientos prehistóricos del Antiguo Pleistoceno sugieren que éramos hasta cierto punto carnívoros. Se presupone que también se recolectaban productos botánicos, incluidas frutas, tubérculos y cereales. Esto se ha confirmado por estudios de grupos étnicos que en tiempos actuales viven como cazadores y recolectores de alimento en equilibrio ecológico con la naturaleza. La mayor parte de las personas en la sociedad industrializada moderna son aún omnívoras en sus hábitos alimentarios. La parte vegetariana de la dieta se ha desarrollado durante un largo período de la evolución cultural y más o menos se ha perdido completamente la conexión con el medio en el que vivimos ahora. El mayor avance tuvo lugar con la producción de plantas alimentarias (Fernández-Armesto, 2001).

Uno de los primeros sucesos revolucionarios ha sido la invención de la cocina, la cual puede ser considerada como un episodio de diferenciación humana con el resto de la naturaleza. Existe una conexión cercana con otra revolución, el descubrimiento de la agricultura incluyendo la selección y producción de plantas comestibles las cuales sólo son apetitosas después de ser cocinadas, tales como las legumbres y los cereales.

Hasta el siglo XIX casi nada se sabía sobre la composición de las diferentes clases de alimentos y los requerimientos nutricionales del ser humano. El descubrimiento reciente de la composición de los nutrientes de los alimentos y los requerimientos nutricionales del hombre es el principal acontecimiento revolucionario moderno, el cual ha tenido un considerable impacto en nuestros hábitos alimentarios. Sabemos con seguridad que los carbohidratos,



aminoácidos, lípidos, vitaminas y elementos trazas son esenciales para el crecimiento y mantenimiento de la salud (Bast et al., 2002).

Muchos son los esfuerzos que se han centrado en desarrollar nuevas medicinas para la prevención de enfermedades, obteniéndose resultados exitosos. Ciertos tipos de cánceres se tratan hoy día con éxito, como algunas formas de cáncer infantil y cánceres para los cuales se ha esclarecido su historial genético y su etiología. Se han obtenido importantes progresos, gracias a las mejoras técnicas, que nos permiten una detección temprana de la enfermedad o la identificación de individuos genéticamente predispuestos a sufrir ciertas enfermedades. Existen evidencias de que muchos constituyentes de los productos botánicos comestibles pueden mantener la salud, ayudando a prevenir la enfermedad o incluso inhibiendo el ataque de ésta en una etapa temprana (Anter et al., 2011 a). Se sabe desde hace tiempo que la ingesta de antioxidantes puede contribuir a una reducción de la intensidad de enfermedades cardíacas, disfunciones circulatorias y cataratas (van Poppel y Goldbhohm, 1995), aunque una sobredosis provocaría efectos pro-oxidativos indeseables. Estudios experimentales y epidemiológicos clásicos demuestran que los vegetales pueden ayudar a prevenir ciertas formas de cáncer (Verhoeven et al., 1996), estando extensamente aceptado que muchos componentes botánicos pueden contribuir al mantenimiento de la salud humana. Estos componentes no están normalmente clasificados como nutrientes o micronutrientes, incluso forman parte de nuestros alimentos "habituales" (Bast et al., 2002).

Se estima, que alrededor de la tercera parte de todos los cánceres humanos podrían estar relacionados con la dieta (Meadows, 2012). Existe una vasta literatura sobre factores alimentarios que están relacionados con la mutagénesis y carcinogénesis (Ferguson, 1994):

- sustancias de origen natural como ciertos flavonoides, cumarinas, ciertos glucosinolatos, taninos, quinonas, hidracinas, alcaloides de pirrolizidina o micotoxinas;
- sustancias derivadas de la cocción de alimentos como las aminas heterocíclicas;
- sustancias resultantes de la pirolisis de materia orgánica, combustión de carbones o petróleos como los hidrocarburos aromáticos;
- nitrosaminas y nitrosamidas formadas endógenamente o productos de peroxidación lipídica.

Muchos carcinógenos de la dieta pueden originar directamente o bien metabolizarse a compuestos electrofílicos que reaccionan con el ADN (las aminas heterocíclicas, los compuestos N-nitroso, aflatoxinas o hidrocarburos aromáticos policíclicos).



Actualmente hay muchos productos botánicos bajo investigación por su potencial protección de la salud y/o sus propiedades inhibidoras de enfermedades: productos botánicos comúnmente consumidos como vegetales, frutas y condimentos, así como productos botánicos de otras partes del mundo que suponemos o sabemos que son protectores de la salud o que poseen propiedades inhibidoras de enfermedades (Swerdlow, 2000). Durante los últimos 15 años, se ha intentado sistematizar la evaluación de los efectos y eficacia de los productos botánicos y según si el propósito es medicinal (para lo cual debe haber un cierto criterio experto de seguridad y eficacia basado en informes expertos) o de si su propósito es solamente nutricional o promotor del mantenimiento de la salud (con lo cual no se requiere información adicional de seguridad). A continuación pasaremos a definir los siguientes conceptos, debido a la dificultad que encontramos en clasificar los distintos productos botánicos dentro de una u otra categoría (Bast et al., 2002):

- **Alimento:** Un producto botánico que es considerado como un producto alimentario tradicional integrado en la dieta. Su propósito primario es proporcionar sustratos para el metabolismo anabólico/catabólico y procesos fisiológicos, y/o intensificar el gusto y sabor de los alimentos.
- **Productos Botánicos Saludables:** Un producto botánico que no es consumido primariamente como una fuente de sustratos para el metabolismo, pero que tiene propiedades que pueden ayudar al mantenimiento y/o promover la salud.
- **Productos Botánicos Herbales:** Un producto botánico que es usado para curar, tratar, y/o prevenir una enfermedad, o clínicamente para determinados desórdenes. Dentro de este grupo estarían integradas las plantas sometidas a estudio en el presente trabajo de Tesis, cuando alguno de sus componentes se aísla y es usado como droga, o cuando se usa el aceite esencial de la planta. El pertenecer a este grupo, depende claramente del modo en que se administre esta planta, ya que si se toma como bebida (en infusión) sería excluida de él, para formar parte del grupo de *Productos Botánicos saludables*.

Gulati y Ottaway (2006) presentan una clasificación algo más amplia atendiendo al uso del producto del que se trate; estableciendo un subgrupo de clasificación llamado *Producto herbal medicinal tradicional*, para los cuales ya existe una normativa específica dentro de la Unión Europea (2004/27/EC), atendiendo al "uso tradicional" de los productos herbales.

Dentro del grupo de productos botánicos hay un amplio rango de variación con respecto a sus propiedades. Algunos productos son propiamente alimentos y otros se acercan



o son medicinas. Los productos botánicos son regulados de modo diferente dentro de los diferentes Estados miembros de la Unión Europea y globalmente. Son regulados como alimentos o como productos medicinales, y en casos más recientes muchos siguen unos procedimientos de registro simplificado. Estas diferencias se deben a variaciones de su uso tradicional, culturales y antecedentes históricos, en la comprobación científica y en la aplicación de la actual legislación. En la Legislación de la Unión Europea tienen suficiente cabida las diferentes ofertas. Los puntos fuertes o las debilidades de los diferentes procedimientos de regulación han sido revisados y evaluados como buenos por los métodos actuales para la valoración de la calidad, eficacia y seguridad (Bast et al., 2002).

Desde 2003 hasta 2007, los países miembros de la UE han modificado sus normativas en cuanto a crear listados de productos herbales atendiendo a diferentes clasificaciones, con el firme compromiso de regular el uso de los productos herbales, por cuestiones de calidad, eficacia y seguridad. Gulati y Ottaway (2006) realizaron un amplio estudio a este respecto.

Dentro de Europa existen grandes diferencias entre los Estados miembros tanto en la clasificación legal como en los requerimientos necesarios para obtener la autorización de mercado para los productos botánicos. Estas diferencias de puntos de vista son, no solamente, por diferencias en la tradición, históricas y antecedentes culturales sino también por diferencias en las aplicaciones prácticas.

No hay consenso, por tanto, en la clasificación de los productos botánicos, y básicamente nos hallamos ante dos grupos:

1. *Producto botánico saludable bajo legislación de alimento.* Son suplementos alimenticios, nutrientes y otras sustancias con efectos nutricionales y fisiológicos (Directive 2002/46/EC). Pero las leyes actuales de alimentos de la Unión Europea no permiten el uso de productos relacionados con la prevención de enfermedades o la reducción de los riesgos de enfermedad por alimentos. Como consecuencia, la comunicación de estos beneficios a los consumidores está prohibida, incluso en casos donde el producto ha sido probado que es efectivo. (Gulati y Ottaway, 2006).

En 2007, la Comisión Europea se comprometió a presentar al Parlamento Europeo y al Consejo, un informe sobre la conveniencia de establecer normas específicas, incluyendo en su caso listas positivas, en la categoría de nutrientes o de sustancias con un efecto nutricional o fisiológico.

2. *Productos medicinales herbales bajo la legislación farmacéutica.* En 1996, la



Comisión Europea:

- valoró las propuestas de productos medicinales herbales de los diferentes Estados miembros.
- comparó las prácticas actuales en la valoración de calidad, seguridad y eficacia.
- hizo recomendaciones sobre qué es lo mejor para salvaguardar la salud pública mientras se esté permitido el libre movimiento de los productos medicinales herbales en todas partes de la Unión Europea (Gulati y Ottaway, 2006).

1.2. Transformación metabólica de los xenobióticos

En el interior de los organismos, los xenobióticos, pueden sufrir procesos de transformación metabólica por los sistemas enzimáticos, que en mamíferos están localizados en el hígado y a nivel celular en el retículo endoplásmico y en el citosol, convirtiendo los compuestos lipofílicos en otros más polares, y por tanto más fácilmente excretables (Croom, 2012). Así, se disminuye la vida media de los contaminantes en el interior de los organismos, se reduce el tiempo de exposición y se evita su bioacumulación.

La biotransformación de xenobióticos es generalmente un proceso que implica una serie de reacciones secuenciales o etapas, divididas normalmente en dos clases: reacciones de *fase I* y de *fase II*. Las de *fase I* introducen en el xenobiótico grupos polares (generalmente un grupo hidroxilo) mediante oxidación, reducción, hidrólisis o hidratación. El metabolito resultante es más hidrofílico que el de partida y se prepara así para la reacción posterior. En la *fase II*, el grupo polar del metabolito es conjugado con moléculas endógenas, también muy polares (glutatión, aminoácidos, ácido glucurónico, grupos sulfato, metilo o acetilo) (Timbrell, 2001). Como resultado del conjunto de reacciones, se originan compuestos aún más solubles y por tanto, más excretables. El grado en que tiene lugar la biotransformación está condicionado por factores tales como la edad, la dieta, el estrés, la especificidad de tejido u órgano, la dosis del compuesto o el grado de inducción o inhibición de las enzimas responsables (Gibbs et al., 2007).

Muchas enzimas implicadas en la biotransformación de xenobióticos no sólo producen inactivación (o detoxificación) de un compuesto, sino que también pueden activar compuestos a metabolitos electrofílicos muy reactivos y por tanto más tóxicos, capaces de unirse al ADN u otras biomoléculas produciendo efectos citotóxicos, mutagénicos y/o carcinogénicos (Abril et al., 1995), este proceso es debido, fundamentalmente, a que muchas de estas enzimas forman parte de las rutas metabólicas de los organismos y por tanto no son específicas para los



sustratos endógenos y/o exógenos sobre los que actúan, ni para la función de destoxicación. Este efecto se conoce como activación metabólica (Aldridge, 1996). La inserción de un átomo de oxígeno o la conjugación catalizada por una enzima de *fase II* puede formar un intermediario reactivo que, tras sufrir reordenaciones, origine un compuesto inestable. Los intermediarios reactivos interaccionan con grupos nucleofílicos, como los grupos sulfhidrilo de las cisteínas y metioninas de las proteínas, o los grupos amino e hidroxilo del ADN, el ARN o las proteínas (Aldridge, 1996). Entre las diferentes enzimas implicadas en la metabolización de xenobióticos, las que mayor atención han despertado han sido: (i) **Las monooxigenasas dependientes del citocromo P-450**. (ii) **Flavin monooxigenasas**, intervienen en las reacciones de *fase I*. (iii) Otro sistema de monooxigenasa es el **citocromo b₅** que al igual que los dos anteriores participa en las reacciones de *fase I*. (iv) **Las epóxido hidrolasas** constituyen otro grupo de enzimas de *fase I*. Catalizan la conversión de epóxidos en dihidrodioles, los cuales son menos reactivos que los epóxidos parentales. (v) **Las glutatión-S-transferasas** (GSTs) que constituyen una familia de enzimas de fase II que conjugan el tripéptido glutatión en su forma reducida con una gran variedad de moléculas electrofílicas hidrofóbicas. Estas enzimas participan en la biotransformación de fármacos, carcinógenos y contaminantes y en la resistencia a plaguicidas (Ranganathan et al., 1993). (vi) **Las sulfotransferasas** conjugan xenobióticos activados en la *fase I* con grupos sulfato. En muy raras ocasiones, la conjugación con sulfato puede incrementar la toxicidad de los sustratos (Timbrell, 2001). (vii) **Las N-acetiltransferasas** conjugan xenobióticos que contienen grupos amino con grupos acetilo provenientes de la acetil-CoA (Timbrell, 2001).

La bioactivación de muchos xenobióticos, que pasan del estado de promutágenos a convertirse en compuestos mutagénicos, puede estar provocada por la biotransformación.

1.3. Estrés oxidativo

Los organismos aerobios utilizan O₂ como aceptor final de electrones para obtener energía a partir de la cadena respiratoria, además de con fines defensivos durante la fagocitosis (Winston y Di Giulio, 1991). Sin embargo, el O₂ también presenta desventajas, pues, cuando no se reduce completamente a H₂O mediante el aporte de dos electrones, se generan especies reactivas de oxígeno (EROs) muy tóxicas que dañan todo tipo de biomoléculas: ácidos nucleicos, proteínas, glúcidos y lípidos (Kruk, 1998). En condiciones normales, las EROs son eliminadas rápidamente. Pero en determinadas ocasiones, la velocidad de producción de EROs puede aumentar y sobrepasar estos mecanismos, dando lugar a una

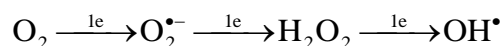


situación conocida como estrés oxidativo (Winston y Di Giulio, 1991). Las EROs participan en diversos procesos biológicos, como envejecimiento, la mutagénesis, la carcinogénesis o la apoptosis (Sies, 1985; Kruk, 1998; Yan et al, 2012; Qiao et al., 2013).

Las EROs se producen como intermediarias a partir de la reducción unielectrónica del O_2 , a través de diversas reacciones, catalizadas enzimáticamente o no (Sies, 1986; Winston y Di Giulio, 1991; Alejandre-Durán et al., 1987). Las reacciones más numerosas son las que dan lugar a la formación del radical anión superóxido ($O_2^{\bullet-}$) el cual se produce a partir de la autooxidación de pequeñas moléculas endógenas y de metales de transición, la actividad de enzimas oxidasas y deshidrogenasas y en la cadena de transporte electrónico del retículo endoplásmico y de la mitocondria (Winston y Di Giulio, 1991; Kruk, 1998).

El Peróxido de Hidrógeno (H_2O_2) se forma por desmutación espontánea o enzimática del anión superóxido, o por reducción dielectrónica directa del O_2 , catalizada por diversas enzimas (Fridovich, 1989; Kruk, 1998). Aunque sin duda la especie más reactiva es, con diferencia, el radical hidroxilo (OH^{\bullet}).

La reducción molecular del oxígeno puede seguir la reacción en cadena que se indica a continuación:



Los daños oxidativos sobre las biomoléculas, pueden ser reversibles o irreversibles (Winston y Di Giulio, 1991; Kruk 1998). Las proteínas sufren roturas irreversibles de los anillos en las cadenas laterales de los residuos de His y Trp, o rotura del enlace peptídico a nivel de los residuos Pro. Otra alteración muy importante, aunque reversible, es la formación de puentes disulfuro entre cadenas laterales de Cys, que puede conducir a la inactivación temporal de enzimas (Kruk, 1998).

El ADN sufre varios tipos de daños, como consecuencia de la actuación de las EROs. Entre ellos, se pueden citar: rotura de cadenas, alteración química de bases, aberraciones cromosómicas e intercambios entre cromátidas hermanas. Todas ellas pueden conducir a la aparición de mutaciones. De modo que la oxidación representa la mayor contribución al daño genético basal (Burcham, 1999). Ciertas estimas dan un número total de bases oxidadas excretadas por humanos de aproximadamente 11.500 por célula y día (Helbock et al., 1998); de ellas probablemente los mayores culpables sean el anión superóxido y el Peróxido de



Hidrógeno. Mutantes deficientes en superóxido dismutasa y en catalasa, que son enzimas claves en el secuestro de antioxidantes, exhiben tasas de mutación espontáneas muy elevadas (Alonso-Moraga et al., 1987).

La abundancia de mutaciones en pares de bases G:C en la replicación de ADN oxidado sugiere que el daño es particularmente importante en dG o en dC. Un producto importante de la oxidación de la dG que es ampliamente estudiado es el 8-oxo-2'-de-oxiguanosina (8-oxo-dG). Por lo que podemos incluirlo como la mayor lesión premutagénica que se da *in vivo*, introduciendo transversiones G:C a T:A, y se considera un marcador muy popular del daño oxidativo en el ADN (Radak et al., 2011).

El radical hidroxilo, bien procedente del metabolismo celular, bien producido en situaciones de estrés oxidativo, es un importante intermediario en los procesos oxidativos al ADN (Sies, 1986).

Las células cuentan con múltiples líneas de defensa frente a las EROs constituyendo el llamado sistema de defensa antioxidativo. Las defensas antioxidativas han sido detectadas en todos los organismos aerobios (Winston y Di Giulio, 1991). Puesto que muchos agentes ambientales actúan incrementando la producción de EROs por los seres vivos, estos mecanismos tienen una gran importancia en la defensa contra la contaminación ambiental.

En el sistema de defensa antioxidativo se pueden distinguir tres tipos de elementos (Kruk, 1998):

- i. defensa enzimática antioxidativa: lo componen diversas enzimas que detoxifican directamente las EROs.
- ii. defensas no enzimáticas: algunas moléculas, como las vitaminas C y E, y los polifenoles son capaces de detoxificar EROs interrumpiendo la cadena de reacciones que las generan.
- iii. sistemas enzimáticos auxiliares: algunas enzimas, como la glucosa-6-P deshidrogenasa o la glutatión reductasa, participan en el mantenimiento de un estado redox intracelular reducido, al generar el poder reductor, en forma de NADPH y GSH, que se consume durante la producción y detoxificación de las EROs.



1.4. Ensayos de genotoxicidad

Las mutaciones en el ADN constituyen una etapa fundamental en la aparición y desarrollo de tumores. El hecho de que muchos de los agentes con actividad carcinogénica presenten también actividad mutagénica (McCann et al., 1975), y que oncogenes se activen como consecuencia directa de la actividad mutagénica de compuestos químicos (Barbacid, 1986), así lo demuestra. La necesidad de evaluar la actividad mutagénica de un gran número de sustancias potencialmente carcinogénicas ha conducido al desarrollo de ensayos de corta duración.

La elección de un sistema metabólico adecuado es de gran trascendencia para la eficacia de los ensayos de corta duración en la detección de agentes genotóxicos, y particularmente importante para evitar falsos-negativos. Sin embargo, debido a la gran complejidad y variabilidad en el proceso de metabolización de xenobióticos, ningún sistema metabólico individual puede mimetizar todas las situaciones *in vivo*, ni siquiera para una única especie. Por lo tanto, cuando se ensaya un compuesto en múltiples test de corta duración, es preferible incluir diferentes sistemas de activación metabólica. La interpretación de los resultados de un test y su extrapolación a un organismo intacto debe hacerse con precaución y en el contexto de resultados de otros test toxicológicos y de otra información disponible.

La aparición de test de corta duración destinados a estudiar los posibles efectos carcinogénicos de sustancias químicas en base a sus propiedades mutagénicas, se vio incrementada a raíz de los estudios de Ames y colaboradores (1973) en cepas auxotróficas para histidina en *Salmonella typhimurium* con el que detectaban mutaciones revertientes y con el que pusieron de manifiesto la relación entre las propiedades mutagénicas y carcinogénicas de sustancias químicas.

Estos test detectan diferentes alteraciones genéticas en células u organismos completos con diferente nivel de organización. Así, se han llegado a describir más de 200 ensayos, en una gran variedad de organismos, *in vitro* desde bacteriófagos a células humanas pasando por las bacterias y diversos tipos de estirpes celulares animales, e *in vivo*, sobre plantas, insectos o mamíferos, capaces de detectar diferentes tipos de alteraciones genéticas. Muchos de tales ensayos detectan alteraciones genéticas concretas, como mutaciones puntuales, aberraciones cromosómicas estructurales o pérdida de cromosomas. Sin embargo, los efectos genéticos detectados por otros tipos de ensayos se relacionan con daños reparables en el ADN o interacciones con el material genético inespecíficas o no del todo definidas.



La eficacia de un ensayo de corta duración se valora en función de la concordancia entre los resultados de mutagenicidad y los datos de carcinogenicidad existentes y se puede expresar en términos de sensibilidad (proporción de carcinógenos correctamente identificados en el ensayo de genotoxicidad) y especificidad (proporción de no carcinógenos correctamente identificados). Sin embargo, estos valores no son siempre constantes para cada tipo de ensayo de genotoxicidad.

La discrepancia de resultados entre distintos ensayos está relacionada con la fiabilidad de los datos de carcinogénesis y, fundamentalmente, con la clase química de los compuestos analizados. En primer lugar, hay que tener en cuenta que la validez del ensayo de corta duración se calcula comparando el resultado de genotoxicidad con el dato de carcinogenicidad existente, asumiendo así que éste es correcto. En segundo lugar, los valores de correlación encontrados están influidos por la clase química de los compuestos analizados incluidos en la base de datos utilizada.

Por otro lado, se ha comprobado que no hay una correlación cuantitativa entre potencia mutagénica y carcinogénica, lo que podría ser debido a que los mecanismos moleculares de la mutagenicidad no son idénticos a los que inician el cáncer. La activación de oncogenes es diferente en función de la localización de sus productos génicos. Esto parece indicar que los mecanismos de carcinogénesis dependen del tumor concreto considerado y del carcinógeno implicado.

Los carcinógenos que actúan en la fase de iniciación del tumor mediante la inducción de mutaciones puntuales, serían por tanto, más fácilmente detectables en ensayos de genotoxicidad que aquellos agentes que actúen en la etapa de promoción, en la que habitualmente intervienen procesos epigenéticos (hormonales, por ejemplo). Sin embargo, también es posible que ciertos carcinógenos tengan capacidad de producir alteraciones genéticas, diferentes de las mutaciones génicas o cromosómicas, que escapan a la capacidad de detección del ensayo por no estar diseñado para detectar tales efectos. Entre las alteraciones genéticas no representadas habitualmente en los ensayos de genotoxicidad, cuya implicación en el desarrollo del cáncer parece cada vez más clara están la amplificación génica, la hipometilación del ADN y la recombinación. De ellos, el fenómeno de la recombinación, por su clara relación en el desarrollo de determinados tipos de cáncer, interviniendo en el paso de heterocigosidad a homocigosidad de genes supresores de tumores, es el que más ha centrado la atención de los investigadores, diseñándose en los últimos años ensayos que detectan efectos recombinacionales, tanto en procariotas como en levadura, en *Drosophila* y en mamíferos (Hoffmann, 1992; Hastings, 1992; Vogel, 1992; Fahrig, 1992; Romero-Jiménez et



al., 2005). Además de los eventos epigenéticos "clásicos", como la metilación del ADN y la acetilación de histonas, los mecanismos principales incluyen cambios en las concentraciones de las moléculas de señal (hormonas, factores de crecimiento, ácidos grasos, etc.), modulación de receptores celulares y drogas, enzimas del metabolismo de ácidos grasos y de hormona, estrés oxidativo e interferencia con las rutas de transducción de señales intracelulares (Hofmanová et al., 2000).

A pesar de que la correlación mutagénesis-carcinogénesis ha descendido sobre la inicialmente descrita, no cabe duda que cambios a nivel de ADN son críticos en la carcinogenicidad, y esto proporciona un fundamento básico y lógico para el uso de ensayos de corta duración (Ramel, 1988). Además, la capacidad de un compuesto de producir alteraciones en el material hereditario se considera una información toxicológica esencial, independientemente de la relación con la carcinogénesis, y como tal se recoge en las directivas comunitarias que establecen la información requerida para la autorización de comercialización de sustancias químicas nuevas (C.E.E., 1984, 1988, 1991a, 2001). En los últimos años, la Unión Europea recoge en su Diario Oficial el reglamento comunitario sobre la información alimentaria que se facilita al consumidor, completando y modificando los anteriores, de modo que el control actual sobre los alimentos naturales es más riguroso (<http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2011:304:0018:0063:ES:PDF>).

Para la evaluación de cada uno de los efectos genéticos considerados, es posible utilizar cualquiera de los ensayos descritos. Sin embargo, conociendo el variado conjunto de alteraciones genéticas asociadas con la carcinogénesis, algunos autores piensan que todavía es posible diseñar ensayos de corta duración capaces de detectar efectos hasta ahora no considerados (Ramel, 1986, 1988, 1990, 1991). Efectos como la multiplicación génica, la transposición, la metilación del ADN, la recombinación o efectos indirectos, la producción de radicales libres, la proliferación de peroxisomas o el desequilibrio en el "pool" de nucleótidos, que se sabe están implicados en el proceso de carcinogénesis, están poco o nada representados entre los ensayos de genotoxicidad más frecuentemente utilizados. Su inclusión en las baterías de ensayos utilizadas podría hacer disminuir el número de los denominados hasta ahora carcinógenos no genotóxicos.

Una de las principales fuentes de variación de resultados entre especies parece estar relacionada con las diferencias metabólicas interespecíficas. Muchos de los mutágenos ambientales más representativos, como los hidrocarburos aromáticos policíclicos, o las N-nitrosaminas, no son activos directamente, sino sólo tras sufrir una serie de transformaciones



metabólicas que los convierten en compuestos altamente reactivos con el ADN. Las variaciones interindividuales en la metabolización de procarcinógenos son consideradas determinantes en la diferente susceptibilidad al cáncer (Harris, 1991) y una importante fuente de variación en los resultados de los distintos ensayos de genotoxicidad (Pavanello y Clonfero, 2000; Villatoro-Pulido et al., 2009).

1.4.1. Antimutágenos y anticarcinógenos

Si se evitaran el tabaco, la agresión de los rayos ultravioleta y los carcinógenos de la dieta, sólo restaría luchar contra los cánceres de predisposición genética. Aunque teóricamente sería posible evitar la exposición a todos los carcinógenos de la dieta, se tiene cada vez mayor certeza de que éstos son tantos y tan variados, que sería casi imposible eliminarlos del consumo habitual humano. Una alternativa es realizar un consumo deliberado de anticarcinógenos que pueden inactivar o revertir los efectos de algunos tipos de carcinógenos. Algunos anticarcinógenos se dan naturalmente en fuentes tales como fruta o verduras (Block, 1992; Moriya et al., 2011). Además, existen programas de detección que están continuamente identificando nuevos productos que podrían añadirse a la dieta humana para prevención del cáncer.

Los procesos mutagénicos y carcinogénicos implican la existencia de mecanismos a distintos niveles físicos del organismo y en distintas etapas del proceso mutagénico o carcinogénico. Desde el nivel extracelular al intracelular, desde la inhibición de formación endógena a la desactivación, desde la inhibición de la activación de promutágenos al bloqueo de moléculas reactivas, o bien modulando la reparación del ADN, o la promoción y progresión de tumores. Aunque la relación y descripción de los mecanismos de inhibición de mutagénesis y carcinogénesis es imperfecta, además no se suelen dar aislados o pueden tener efectos colaterales y sinérgicos. Sin embargo, podríamos incluirlos a todos en dos grupos: los verdaderos antimutágenos o **bioantimutágenos**, que serían los factores que disminuirían el potencial mutagénico actuando en el proceso de mutagénesis o de reparación del ADN; y **desmutágenos**, que serían los factores que actuarían sobre mutágenos o sus precursores y los inactivarían por medio de: (i) inactivación química o enzimática, (ii) prevención o formación de especies activas y (iii) antioxidantes y secuestradores de radicales libres.

Antimutágenos y anticarcinógenos son comunes entre muchos remedios herbales tradicionales y terapias dietéticas. Con un mayor entendimiento de la base del mecanismo del



desarrollo y la prevención del cáncer, ahora conocemos mejor las formas en que algunos de estos remedios tradicionales pueden actuar a nivel celular o subcelular (Surh and Ferguson, 2003; Frassinetti et al., 2012).

1.5. Ensayo de mutación y recombinación somáticas (S.M.A.R.T.) en alas de *D. melanogaster*

Los ensayos de mutación somática desarrollados en *D. melanogaster* se basan en que las alteraciones genéticas producidas en las células de los discos imaginales de la larva, pueden evidenciarse fenotípicamente en el tejido adulto después de la expansión clonal y de la metamorfosis.

La mosca de la fruta *D. melanogaster* ha sido utilizada en estudios genéticos desde principios del siglo XX, cuando comenzaron los trabajos de Morgan. El pequeño tamaño, corto ciclo vital y escasos requerimientos nutricionales de este insecto facilitan su mantenimiento en el laboratorio y hacen posible la obtención, durante varias generaciones, de un gran número de individuos, necesarios para el análisis genético. Además, el pequeño genoma de *D. melanogaster* (1/20 del tamaño de un típico genoma de mamífero) facilita el análisis molecular. Estas ventajas han determinado que en la actualidad se conozca su genoma completo (FlyBase, <http://flybase.org/>) y se hayan descrito y analizado más de 29800 genes, existiendo además, numerosas mutaciones que pueden ser utilizadas como marcadores. Por lo tanto, se puede decir que *D. melanogaster* es el organismo eucariota multicelular holometábolo mejor conocido genéticamente.

Estas células indiferenciadas son a su vez de dos tipos: los histoblastos, que no se dividen durante el periodo larvario y formarán la cutícula abdominal del adulto, y los discos imaginales, que se dividen rápidamente en momentos específicos en la larva, siendo la diferenciación de las células imaginales durante la metamorfosis la que dé lugar a las estructuras de la mosca adulta. En *Drosophila* hay 10 pares principales de discos imaginales, que reconstruyen todo el integumento del adulto (excepto el abdomen), y un disco genital, que forma las estructuras reproductoras (figura 1.2.). A medida que proliferan, las células de los discos imaginales forman un epitelio tubular que se repliega en una espiral compacta. La proliferación celular en cada uno de los discos imaginales no es idéntica. Las divisiones mitóticas en el disco del ala comienzan a partir de las 24 horas de la formación del huevo y



continuará hasta la formación de la pupa; mientras que en el disco del ojo la proliferación celular cesa antes, por lo que el número de células al final del desarrollo larvario es menor en el disco ocular que en el del ala (figura 1.3.).

El ensayo de mutación y recombinación somáticas en ala, utiliza dos marcadores que afectan al fenotipo de las células del ala: *mwh* y *flr*. El ensayo fue descrito por Graf y colaboradores (1983, 1984 y 1989) y ha demostrado su capacidad de detectar mutaciones puntuales, deleciones, ciertos tipos de aberraciones cromosómicas y recombinación mitótica.

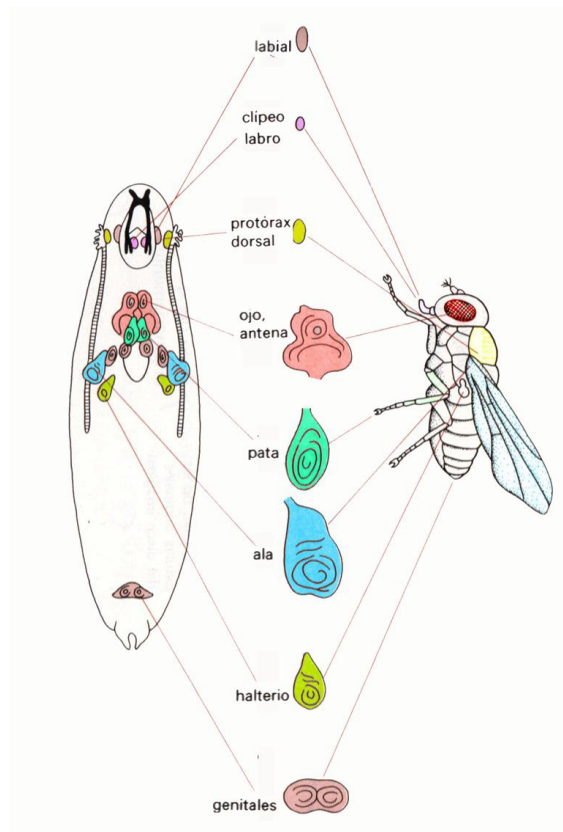


Figura 1.2. Discos imaginales de la larva de *Drosophila* (esquemáticos) y las estructuras adultas a las que da lugar. Tomado de Alberts et al. (1986).

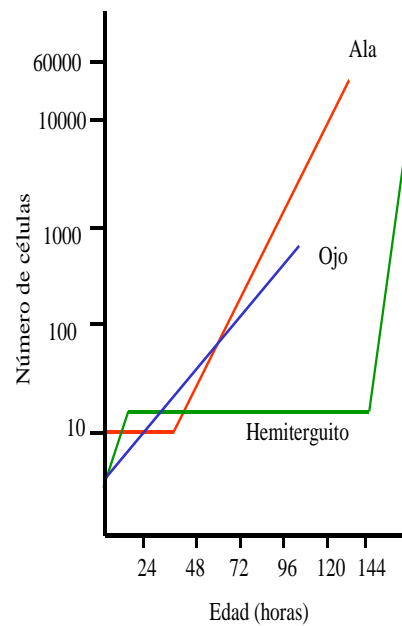


Figura 1.3. Número de células durante el crecimiento de los discos imaginales. Tomado de Würzler y Vogel (1986).

La principal ventaja del ensayo en alas, frente a los que utilizan mosaico de ojos, reside en el hecho de que el número de células en los discos imaginales del ala es mucho mayor que



en los discos oculares. Los discos imaginales del ala y del ojo comienzan a dividirse al mismo tiempo, pero los oculares cesan la división a las 80 horas, mientras que los alares continuarán hasta las 120-140 horas. Así, el número de células al final del desarrollo larvario es de unas 3000 en cada disco imaginal antena-ojo y de unas 52000 en cada disco mesotorácico, de las cuales unas 26000 células corresponden al ala (Ashburner, 1989). Por lo tanto, al final del periodo larvario los discos imaginales del ala tienen un mayor número de células que pueden ser expuestas. Además, las moscas tratadas pueden almacenarse en etanol al 70% para un análisis posterior y pueden hacerse preparaciones permanentes de alas, susceptibles de posteriores análisis (Graf et al., 1984).

El ensayo de mutación y recombinación somáticas en alas de *D. melanogaster* ha mostrado ser capaz de detectar actividad genotóxica en compuestos de variada estructura química, tanto mutágenos directos como promutágenos, y con diferentes modos de acción genotóxica, como agentes alquilantes, intercalantes o formadores de aductos, tanto sólidos como líquidos o gaseosos (Graf et al., 1984). Así como de mezclas complejas (Fernández-Bedmar et al., 2011).

Las larvas utilizadas en los primeros experimentos eran fruto del cruzamiento de las siguientes estirpes: ♀ *y; mwh jv* X ♂ *y; Dp(1;3) scJ4, flr/TM1, Mé ri sbd2*.

A lo largo de la década de los 80, se fueron introduciendo mejoras metodológicas en el ensayo, destinadas a facilitar su desarrollo y la detección de los efectos genotóxicos de los compuestos analizados. Así, el alelo *flr*, utilizado como marcador, se sustituyó por el *flr³*, por presentar éste una mejor expresión en clones pequeños; se eliminaron algunas mutaciones prescindibles que interferían en la expresión de las mutaciones utilizadas como marcadores (por ejemplo, la duplicación *Dp(1;3) sc^{J4}* influye en la expresión de *mwh*). Se desarrollaron así nuevas cepas a utilizar rutinariamente: *mwh* y *flr3/TM3, BdS* (Graf, 1986; Graf et al., 1989).⁽¹⁾

⁽¹⁾ La mutación *Bd^S* (Beaded-Serrate) se incluye en la actualidad como un alelo del locus *Beaded*, aunque originalmente se denominó *Ser* (Serrate) (Lindsley y Zimm, 1992). A pesar de que muchos autores utilizan hoy en día la nomenclatura original, en este trabajo utilizaremos la nueva denominación *Bd^S* para referirnos a alelo originalmente descrito como *Ser*.



Desde entonces, el cruzamiento generalmente utilizado, denominado cruzamiento estándar, es ♀ *mwh* X ♂ *flr³/TM3, Bd^f*, o bien, el recíproco ♀ *flr³/TM3, Bd^f* X ♂ *mwh*, ya que ambos tipos de larvas responden de igual forma a la actividad de genotoxinas, ofreciendo este último cruzamiento la ventaja de que al presentar las hembras de la cepa *flr³/TM3, Bd^f* mayor fertilidad que las de la *mwh*, resulta más fácil obtener un elevado número de larvas para los tratamientos (Graf y van Schaik, 1992).

Una de las principales ventajas de los ensayos S.M.A.R.T. es que es posible detectar actividad genotóxica de promutágenos. La capacidad de las larvas de *D. melanogaster* de transformar una gran variedad de promutágenos en metabolitos activos se ve reflejada en los resultados positivos obtenidos para promutágenos como nitrosaminas, triacenos, aflatoxinas o alcaloides de pirrolicidina (Graf *et al.*, 1984, 1989). Aparte de esta evidencia indirecta, los estudios bioquímicos dan cuenta de la presencia en *Drosophila* de enzimas implicados en el metabolismo de xenobióticos (Baars, 1980). Sin embargo, hay dos clases de procarcinógenos que son difíciles de detectar en *Drosophila*: los hidrocarburos aromáticos policíclicos y las aminas aromáticas. Así pues, una de las principales vías de investigación en relación a los ensayos somáticos de *Drosophila* ha sido la destinada a mejorar la capacidad de detección de promutágenos. En el caso del ensayo de alas, la estrategia utilizada fue la incorporación de cepas con una alta capacidad metabólica genéticamente determinada. Así, Frölich y Würigler, en 1989, sustituyeron los cromosomas 1 y 2 de las cepas utilizadas en el ensayo de alas (*mwh* y *flr³/TM3, Bd^f*), por los de una cepa Oregón seleccionada por su resistencia a DDT (ORR) y caracterizada por una alta expresión constitutiva de enzimas metabolizadoras de xenobióticos. El nuevo cruzamiento, utilizando estas cepas, se denominó cruzamiento de alta bioactivación:

♀ *ORR1/ORR1; ORR2/ORR2; mwh/mwh* X ♂ *ORR1/ORR1; ORR2/ORR2, flr³/TM3, Bd^f*

y con él se analizó la actividad genotóxica de ciertos promutágenos. La utilización de este nuevo cruzamiento facilitaba la detección de genotoxicidad en compuestos de variada estructura química: nitrosaminas, carbamatos o hidrocarburos aromáticos policíclicos (Frölich y Würigler, 1989, 1990 a y b). Se observaron, no obstante, una serie de desventajas fundamentalmente técnicas: aparición con cierta frecuencia de clones de células con irregular patrón de desarrollo que dificultaba el análisis microscópico de las alas; gran variación entre los resultados de experimentos repetidos; baja producción de huevos por parte de las hembras utilizadas en el cruzamiento, así como un retraso en el desarrollo de las larvas. Con el fin de soslayar estas desventajas, Graf y van Schaik (1992), proponen la utilización del cruzamiento ♀ *ORR1/ORR1; ORR2/ORR2, flr³/TM3, Bd^f* X ♂ *mwh/mwh*, denominado cruzamiento de alta



bioactivación mejorado, después de demostrar que éste no presentaba las desventajas prácticas del cruzamiento de alta bioactivación original y mantenía la capacidad de detección de promutágenos. Utilizando este cruzamiento, Graf y colaboradores (1992, a) detectaron actividad mutagénica y recombinogénica en el carcinógeno p-dimetilaminoazobenceno, que había arrojado previamente resultados negativos con el cruzamiento estándar.

Otra aproximación al problema de las desventajas técnicas observadas en el cruzamiento de alta bioactivación ha sido la de Pacella, quien en 1992 construyó unas nuevas cepas de alta bioactivación, a partir de la cepa ORR resistente a DDT, de la cual había eliminado previamente el gen responsable del patrón distorsionado de las células del ala. Describió así un nuevo cruzamiento homocigoto de alta bioactivación, denominado NORR (nuevo ORR):

♀ *NORR1/NORR1; NORR2/NORR2; flr³/TM3, Bc^F* X ♂ *NORR1/NORR1; NORR2/NORR2; mwh/mwh*.

Este cruzamiento será descrito en el apartado de materiales y métodos, ya que es uno de los utilizados en el presente trabajo.

En cuanto a la actividad recombinogénica detectable en los diferentes ensayos S.M.A.R.T., en el ensayo de alas es, además, cuantificable, analizando las alas de las moscas heterocigotas *mwh/TM3, Bc^F*. En estas moscas, la inversión múltiple *TM3* impide los procesos de recombinación en la región afectada y por lo tanto, las manchas detectadas se producen exclusivamente por mutación.

El modelo S.M.A.R.T. ha mostrado ser muy apropiado para llevar a cabo ensayos de antigenotoxicidad, ya que las larvas de *Drosophila* pueden ser tratadas con sustancias simples o con mezclas complejas, tal como son consumidas por el hombre. La mezcla compleja, por tanto puede consistir en un tratamiento conjunto de mutágeno y antimutágeno. También se pueden realizar pre y post-tratamientos con el mutágeno y el antimutágeno (Graf et al., 1998). Desde hace más de dos décadas el sistema S.M.A.R.T. está siendo validado y utilizado en su capacidad para detectar antimutágenos frente a mutágenos y carcinógenos muy variados, así como para la detección de efectos sinérgicos de varias sustancias.

Han sido estudiados los efectos inhibidores y protectores de la genotoxicidad de la clorofilina frente al Trp-P-2 (3-amino-1-metil-5H-pirido[4,3-b]indol) (Negishi et al., 1989), frente a los rayos gamma (Zimmering et al., 1990), frente al óxido de cromo (Olvera et al., 1993) y frente a varios carcinógenos (Negishi et al., 1994). Igualmente, se ha comprobado la



supresión de genotoxicidad por la epigallocatequina galato frente a carcinógenos (Hayatsu et al., 1992), la protección del ácido ascórbico contra los efectos genotóxicos de los rayos gamma y del óxido de cromo (Olvera et al., 1995) y la de compuestos derivados del Selenio frente a dicromato potásico (Rizki et al., 2001). También ha sido demostrado que varios analgésicos antipiréticos tienen actividad antimutagénica ante la mitomicina C (Sato et al., 1996). En cuanto al efecto antimutagénico de mezclas complejas, se ha estudiado el efecto inhibitor de la antimutagenicidad frente a mutágenos y carcinógenos conocidos del café instantáneo (Abraham, 1994; Abraham y Graf, 1996), de la cúrcuma (EL Hamss et al., 1999), de la pimienta verde y negra (EL Hamss et al., 2003) y de ciertos aceites esenciales de plantas medicinales (Idaomar et al., 2002).

En los últimos años, nuestro grupo de investigación ha analizado la actividad desmutagénica de infusiones de plantas medicinales tradicionales (Romero-Jiménez et al., 2005), así como la actividad genotóxica del rábano (*Raphanus sativus*, L.) cultivado en suelos contaminados (Villatoro-Pulido et al., 2009) y la capacidad antioxidante de tres fenoles contenidos en *M. chamomilla* y *U. tomentosa*, como son la *Apigenina*, el *Bisabolol* y *Ácido Protocatecuico* (Anter et al., 2011 c). Además se han estudiado los efectos genotóxicos, antigenotóxicos de otros fenoles como la *oleuropeína* y la *luteolina* como componentes del aceite de oliva y de extractos de hoja de olivo (Anter et al, 2011 b) y del zumo de naranja y de limón, y dos de sus componentes, la *Hesperidina* y el *Limoneno* (Fernández-Bedmar et al., 2011).

1.6. Ensayo de citotoxicidad

Al igual que es importante detectar posibles agentes anti o genotóxicos para nuestra salud, también se deben identificar aquellos con propiedades anti o carcinogénicas.

La aparición de un daño genético puede no desembocar en la aparición de un cáncer. Por el contrario, existen numerosos agentes que sí inducen esta aparición o que por el contrario, son capaces de combatirla. Por ello, desarrollar métodos capaces de detectar estos tipos de sustancias es una necesidad en las sociedades actuales.

Los procesos de carcinogénesis en humanos son bastante complejos y difíciles de caracterizar dada la gran cantidad de sistemas fisiológicos implicados. Además, se necesita realizar pruebas *in vivo* que aseguren la actividad que tiene un determinado compuesto en un



organismo. Por ello, no cualquier especie animal puede ser utilizada para obtener resultados fácilmente extrapolables a humanos. Hace falta recurrir a mamíferos superiores (mono) y a ensayos de larga duración dado el ciclo de vida de estos. Estos ensayos requieren de gastos considerables de dinero así como de infraestructuras especiales, numerosas medidas de seguridad y de enormes grupos de individuos a los que aplicarles los tratamientos de citotoxicidad. Además, son poco aceptados hoy en día ya que conllevan problemas éticos y sociales, requiriéndose de otros que no reúnan estos inconvenientes pero cuyos resultados sean aplicables a modelos humanos.

Con esta idea, surgió en 1979 el primer comité para la investigación de alternativas al uso de animales en investigación de la Sociedad FRAME (Fundación para el Reemplazo de Animales en Medicina y Experimentación). Es bajo esta necesidad que surgen los ensayos de citotoxicidad *in vitro* que usan cultivos celulares para obtener test con los que evaluar posibles actividades citotóxicas (Balls, 2004).

Al contrario que los ensayos *in vivo*, los ensayos *in vitro* no requieren de grandes infraestructuras ni del manejo de animales vivos (con todos los problemas que estos conllevan), ya que se basan en el cultivo de determinados grupos de células transformadas en lugar del organismo completo. Además, el uso generalizado de estos métodos ha abaratado considerablemente los costes de material y personal necesarios por lo que son más rentables. Los ensayos de citotoxicidad se pueden llevar a cabo rutinariamente usando la prueba de exclusión de Azul Tripán en líneas tumorales humanas. Estos test son capaces de detectar actividades enzimáticas relacionadas con el estrés oxidativo (Doehmer et al., 1990), también se pueden transferir genes de interés a líneas celulares para detectar el efecto de posibles carcinógenos en la actividad de estos genes. Con las técnicas actuales de crecimiento celular, estas líneas celulares se pueden mantener indefinidamente (Fahrig et al., 1998). Estas líneas celulares se han utilizado para detectar bioactividad en numerosos compuestos de plantas medicinales y de la dieta con propiedades anticarcinogénicas (Ito et al., 1998; Guevara et al., 1999; Motohashi et al., 2000; Trouillas et al., 2003; Anter et al., 2011 a).

La línea celular HL-60 pertenece al grupo de líneas inmortales, debido a que son células cancerosas o tumorales, que en el caso de la leucemia se originan a partir del mesodermo. Fue aislada de leucocitos del torrente sanguíneo periférico de una paciente caucásica humana de 36 años de edad que padecía una leucemia promielocítica aguda (Collins et al., 1977).

Las células HL-60 son células transformadas y por lo tanto presentan las características básicas de ellas, como por ejemplo: densidad de saturación incrementada, requerimientos de



factores de crecimiento disminuidos, cambios en la morfología y pautas de crecimiento, alteraciones de la superficie celular, inmortalización, transcripción de genes alterados, incremento de la aglutinación por lectinas, transporte incrementado de glucosa, fibronectina reducida a ausente, liberación de factores de crecimiento de transformación, secreción de proteasas, pérdidas de la capacidad de detener el crecimiento, de la dependencia de anclaje para crecer, de microfilamentos de actina así como, de la inhibición del movimiento por contacto. Estas células se caracterizan por proliferar continuamente en suspensión pero tras un largo periodo de cultivo (4 semanas), pierden su capacidad de división y se diferencian. Presentan aneuploidía y su metafase se caracteriza por la presencia de entre 44-46 cromosomas (Collins et al., 1977). Exhiben capacidad fagocítica y quimiotactismo (Collins et al., 1978; Collins et al., 1987; Gallaguer et al., 1975; Gallaguer et al., 1979).

Ultraestructuralmente, la línea HL-60 presenta una población heterogénea de células donde predomina una morfología variada desde mieloblástica hasta promielocítica, con un diámetro entre 9-25 μ (Gallaguer et al., 1979). El núcleo es bastante grande y redondo presentando entre 2 y 4 nucléolos, situados adyacentes a la membrana nuclear y cromatina dispersa. El citoplasma es basófilo con prominentes gránulos azurófilos. La relación núcleo/citoplasma es relativamente alta (Collins et al., 1978).

En cultivo, se presentan en su mayoría como neutrófilos promielocíticos de núcleo prominente (90%) y en menor porcentaje (10-12%) aparecen formas diferenciadas a mielocitos, metamielocitos y por último, granulocitos (neutrófilos, eosinófilos y basófilos) o macrófagos (monocitos) (Breitman et al., 1980; Collins et al., 1978; Conte-Anazetti et al., 2003; Yen et al., 1987).

Presenta una sobreexpresión de oncogenes celulares específicos "c-myc" y "bcl-2" relacionados con el nivel de diferenciación celular y la apoptosis. (Collins et al., 1987; Koeffler, 1983; Kimura et al., 1995). Las células HL-60 tienen un defecto en la expresión de NQO1 (Li et al., 2003), y carecen de p53 (Wolf y Rotter, 1985).

Las células HL-60 han sido usadas desde hace años, con el fin de detectar los mecanismos por los cuales se induce su diferenciación o apoptosis y así poder establecer los compuestos que sean capaces de inducir diferenciación, siendo candidatos para actuar como agentes quimiopreventivos o quimioterapéuticos contra el cáncer (Fesus *et al.*, 1995; Hong y Sporn, 1997; Suh *et al.*, 1995). Así, se ha inducido la diferenciación celular y la apoptosis *in vitro* con la simple aplicación de diversos compuestos químicos (Huberman y Callahan, 1979; Fernández-Bedmar et al, 2011). Compuestos organosulfurados presentan propiedades



quimiopreventivas conocidas frente a estas células (Heber, 1997; Lea, 1996). Algunos flavonoides y polifenoles inducen diferenciación en células HL-60 (Takahashi *et al.*, 1998; Tamagawa, *et al.*, 1998; Anter *et al.*, 2011 c). Entre los compuestos utilizados que conseguían estos objetivos destacan el *Ácido Retinoico* (Verlinden *et al.*, 1998), el *Dimetil Sulfóxido* (Tarella *et al.*, 1982), la *$\alpha,25$ -Dihidroxitamina D3* (Matsuhisa *et al.*, 1995), el *Fenilbutirato* y el *Fenil Acetato* (Gore *et al.*, 1997; Witt *et al.*, 2000) inducen diferenciación en HL-60. Esto indica que el estado maligno de no diferenciación de este tipo de cáncer puede ser tratado para inducir su diferenciación con agentes químicos (Conte-Anazetti *et al.*, 2003).

Pero no todos los compuestos que inducen la diferenciación son de origen químico, también existen compuestos procedentes de plantas capaces de producir la muerte en este tipo de células y algunas de estas plantas están presentes en nuestra dieta (Strissel y Strick, 2005; Fernández-Bedmar *et al.*, 2011). Así, se han investigado la capacidad de inducir diferenciación en dichas células, de extractos naturales de 398 plantas (Suh *et al.*, 1995). De este estudio se puede concluir que el sistema de la diferenciación de las células HL-60 es un modelo válido y útil para el descubrimiento de los agentes quimiopreventivos o quimioterapéuticos del cáncer contenidos en productos naturales. De esta forma, la inducción de la diferenciación y apoptosis en células tumorales sería una eficiente estrategia en la terapia contra el cáncer (Tsiftoglou *et al.*, 2003). El problema radica en que muchos de los agentes que inducen la apoptosis en este tipo de células tumorales también demuestran citotoxicidad frente a células y tejidos normales (Raffray y Cohen, 1997).

1.7. Medicina Tradicional

A través de la observación, la experimentación y, quizás, la intuición, el hombre ha utilizado las plantas, como alimento y como medicina, y durante siglos éstas han sido su principal remedio curativo. El tratado "De materia médica" del médico griego Dioscórides (I d. C) impreso en 1499 ha constituido durante siglos la obra más importante en cuanto al tratamiento de las enfermedades; y ha sido la base utilizada por Font Quer (1978) para elaborar su obra de consulta y referencia, que nosotros hemos utilizado.

Aunque los efectos medicinales de ciertas plantas son muy conocidos, hasta hace relativamente poco tiempo no se habían aislado y estudiado los componentes activos que producen su acción terapéutica. Estos principios activos son los productos que el metabolismo de la planta genera, acumula o deposita, y que ejercen determinadas acciones medicinales. La



química tradicional catalogaba los principios activos de las plantas medicinales como: aceites volátiles, taninos, amargos, fenoles, flavonoides, vitaminas, minerales, saponinas, alcaloides o mucílago, que otorgan a las plantas que los contienen propiedades curativas muy diversas: analgésicas, antibióticas, diuréticas, tónicas, purgantes, digestivas, depurativas, cicatrizantes, carminativas, balsámicas, calmantes... Debido a que cada especie posee más de un principio activo y, por tanto, más de una propiedad curativa, es corriente que la misma planta pueda ser utilizada en diferentes remedios (Font Quer, 1978).

Existen múltiples formas de extraer y aplicar las sustancias activas –y, por tanto, las propiedades curativas- de las plantas medicinales. Muchas plantas son más efectivas utilizadas de una forma que de otra, o según el modo en que se tomen o se apliquen se utilizan para diferentes dolencias. En función del remedio que convenga utilizar, se usará una u otra parte de la planta, debiendo ser recolectada para ello en el momento preciso. Según Font Quer (1978) podemos utilizar: *la planta fresca*, el extracto, la planta en polvo, el jugo, la maceración, *la infusión*, la decocción, el aceite esencial o esencias, tintura, arcilla, aceite, emplastos y cataplasmas, inhalaciones y baños de vapor, compresas, jarabe, crema o baños.

1.7.1. Propiedades no saludables de las plantas medicinales

En contraste con los productos farmacéuticos, se suele pensar que las plantas no son tóxicas, debido a su origen “natural” y a su uso milenario tradicional. Sin embargo, el consumo de plantas medicinales puede acarrear problemas debidos a su toxicidad intrínseca, adulteración, contaminación, identificación incorrecta, interacciones con drogas o falta de estandarización. El uso indiscriminado de plantas medicinales puede estar asociado a toxicidad en diversos órganos (corazón, hígado, sangre, riñones, Sistema Nervioso Central y piel) y a carcinogénesis. La familia de enzimas del *citocromo P450* puede detoxificar xenobióticos, pero también puede originar compuestos mucho más tóxicos, mutagénicos o carcinogénicos, como se ha visto en apartados anteriores. Al ser las plantas medicinales una mezcla compleja, se espera que contengan constituyentes que actúen tanto como sustratos, como inhibidores o como inductores de las enzimas de activación metabólica de procarcinógenos (Zhou et al., 2004).

Los *alcaloides de pirrolizidina* son un ejemplo de toxicidad procedente de plantas. Los efectos tóxicos más importantes, para compuestos que poseen estructura de diéster macrocíclico, se manifiestan de forma crónica, provocando dolores abdominales, ascitis, pérdida de apetito, incremento considerable de los valores de transaminasas en sangre y



hepatomegalia. Esta sintomatología es consecuencia de una oclusión importante del sistema venoso hepático que conduce a hepatonecrosis (Wiedenfeld and Edgar, 2011). Estos alcaloides también actúan como agentes mutagénicos, teratogénicos e inductores de tumores hepáticos (Bruneton, 1996). El *ácido aristológico* es un alcaloide que produce nefropatías (Huljic, et al., 2008), cáncer de útero (Cosyns, 2003) y cáncer urotelial (Nortier y Vanherweghem, 2007). La activación metabólica en el hígado convierte los compuestos básicos en electrófilos altamente reactivos capaces de reaccionar con macromoléculas celulares formando aductos (deoxiadenosina generalmente) detectables en riñón y útero (Pfau et al., 1990). Algunas de las especies de plantas conocidas que contienen alcaloides causan cáncer en roedores: *Senecio longilobus* (Harris y Chen, 1970), *Petasites japonicus Maxim* (Hirono et al., 1977), *Tussilago farfara L.* (Hirono et al., 1976), *Symphytum officinale* (Hirono et al., 1978), *S. cannabifolis* (Hirono et al., 1979), etc. También *alcaloides pirrolizidínicos* aislados como la *microtalina* (Mattocks y Cabral, 1982; Allen et al., 1975), *heliotrina* (Schoental, 1975), *lasiocarpina* (Svoboda y Reddy, 1972; Rao y Reddy, 1978), *clivorina* (Kuhara et al., 1980), *petasitenina* (Mori et al., 1984) y *ridelina* (Prakash et al. 1999; Chan et al., 1994) son carcinógenos en animales experimentales. En *D. melanogaster* se han estudiado cientos de compuestos carcinogénicos, desde *alcaloides pirrolizidínicos*, en el ensayo de letales recesivos ligados al sexo (Clark, 1959), hasta medicamentos antirretrovirales en el ensayo S.M.A.R.T. (Guimarães, et al., 2012, en prensa).

Los polifenoles, bien ácidos fenólicos, flavonoides monoméricos o polifenoles complejos, como se ha visto en apartados anteriores, son antioxidantes y tienen efectos beneficiosos en la prevención del cáncer, sin embargo, también pueden exhibir propiedades no saludables; concretamente, pueden inhibir la absorción del hierro contenido en los alimentos, provocando una subalimentación (Hurrell et al., 2004).

1.7.2. Propiedades saludables de las plantas medicinales

En la actualidad, los antioxidantes naturales como la *vitamina C*, *vitamina E*, *carotenoides* y *polifenoles* como los flavonoides, están generalmente considerados como los componentes beneficiosos de las frutas y vegetales. Las propiedades antioxidantes de estos componentes son responsables de ciertos efectos protectores de los alimentos contra enfermedades cardiovasculares, ciertas formas de cáncer y/o enfermedades de fotosensibilidad (Peto et al., 1981; Yan et al., 2012). Los efectos beneficiosos de ciertos alimentos, para evitar el envejecimiento, también se han relacionado con los antioxidantes naturales (Fernández-



Bedmar et al, 2011) y actualmente se consideran como alimentos funcionales. Sin embargo, a altas dosis o bajo ciertas condiciones de superoxigenación, estos antioxidantes pueden ejercer actividades prooxidantes tóxicas (Rietjens et al., 2002).

1.8. Plantas medicinales a estudio

Para seleccionar las plantas estudiadas realizamos un sondeo de las actividades imputables tradicionalmente a plantas medicinales utilizando la bibliografía e información de bases de datos sobre etnobotánica y etnofarmacología. Hemos podido comprobar que toda esta información usa como referencia varios tratados botánicos y bases de datos; entre ellas hemos seleccionado las más amplias, que consideramos pueden ser: "Plantas Medicinales" de Font Quer (1978) y "Handbook of phytochemical constituents of GRAS herbs and other economic plants" de Duke (1992). Esta última se halla reflejada y ampliada en Phytochemical and Ethnobotanical Databases (PAEDBs), del Agricultural Research Service de Estados Unidos (<http://www.ars-grin.gov/duke/index.html>).

Para el presente trabajo, se ha seleccionado un grupo de seis plantas de uso mundial y tradicional, debido a su probada actividad antiinflamatoria (*Matricaria chamomilla* y *Uncaria tomentosa*), su actividad digestiva (*Mentha piperita* y *Mentha pulegium*) y su actividad sedante (*Tilia cordata* y *Valeriana officinalis*).



Matricaria chamomilla



Uncaria tomentosa



Mentha piperita



Mentha pulegium



Tilia cordata



Valeriana officinalis



Matricaria chamomilla (Manzanilla).

Es una planta herbácea medicinal digestiva, de la Familia de las Compositae (Astereceae). Se usa en Medicina Tradicional por sus propiedades curativas, que son: antiespasmódicas, calma las contracciones dolorosas del intestino y otras vísceras huecas; sedantes, muy utilizada en los trastornos nerviosos de la menstruación; estimulantes de la digestión, favoreciendo los movimientos peristálticos, intestinales. En general, se usa para problemas digestivos (Font Quer, 1978).

El aceite destilado de las flores secas se emplea contra el eczema, asma y como loción capilar para aclarar el cabello rubio; en este caso también se puede usar una infusión fuerte de flores en vez del aceite. La decocción en forma de cataplasmas o baños se usa contra la irritación de los ojos, conjuntivitis, cansancio, oftalmias y como antiséptico suave; y para tratar la gota, herpes, afecciones de la piel y dolores reumáticos. La manzanilla caliente, envuelta en un paño, se dice que cura el dolor de muelas colocándola sobre la parte afectada (Font Quer, 1978). Su aceite esencial (0.4-1.5 %) es rico en *chamazuleno* y *Bisabolol*, *dicloroéter pohlínico*; flavonoides como *luteolol*, *apigenol*, *quercetol*; cumarinas como *hernianina*, *umbeliferona*; y otras sustancias. Las facultades antiespasmódicas se atribuyen al flavonoide *Apigenina* (Font Quer, 1978). Los principales componentes activos de la *M. chamomilla* son el *α -Bisabolol* (sesquiterpeno), su óxido el *chamazuleno* y la *Apigenina* (flavona). Además contiene otros flavonoides (8%) como las *luteolina*, *crisoeriol*, *Apigenina-7-o-glucósido*, *quercitrina*, *isoramnetina*, *rutina*, *hiperósido*, *jaceidinemo*, *crisospenol*, *crossosplenetina*; y lactosas sesquiterpénicas como *matricina* y *matricarina* (Carretero, 2000) y *Ácido Protocatecuico* (Kováčik et al., 2008). Las partes aéreas de la planta son ricas en sustancias procedentes del metabolismo del ácido mevalónico (Bohlmann y Zdero, 1982): ésteres monoterpénicos bicíclicos derivados del pineno y del bornano, hidrocarburos sesquiterpénicos, *germacreno D*, *β -farneseno*.

Uncaria tomentosa (Uña de gato).

Planta medicinal de la Familia de las Rubiaceae. Hasta hace poco sólo era conocida por los curanderos de la Amazonia peruana. Es más, hasta hace unos años ni siquiera figuraba en los textos más importantes sobre plantas medicinales. Usada por los curanderos de áreas restringidas de la selva, donde crece en forma natural. Se encuentra en el bosque húmedo tropical del continente americano como en: Panamá, Nicaragua, Guyanas, Trinidad, Surinam,



Costa Rica, Belice, Guatemala, Honduras, Venezuela,... desde los 75 a los 1.118 m. sobre el nivel del mar, en zonas con temperatura media anual mínima de 17 °C y media anual máxima de 25.7 °C.

Tradicionalmente se usa la corteza, la raíz y las hojas según la aplicación, en función de la patología que se trate y de la persona que lo aplica. Dentro de las enfermedades tratadas están: procesos inflamatorios de diversa índole, úlcera gástrica, diabetes, enfermedades degenerativas como el cáncer y diversas tumefacciones, irregularidades del ciclo menstrual, convalecencia, debilidad general y gonorrea.

Los componentes activos de *U. tomentosa* son *alcaloides*, ya sean *indoles* u *oxindoles*, *penta* o *tetracíclicos* (Keplinger et al., 1999), además se encuentran en la planta ocho glicósidos del *ácido quinóvico*, cuatro triterpenos polihidroxiados, un precursor de alcaloides y los *ácidos úrsólico* y *oleanólico* (Aquino et al, 1989). Algunas propiedades terapéuticas de la planta se pueden atribuir a sus flavonoides (10-50%): *catequina* y *gambirinas B1* y *B3*. Además posee alcaloides indólicos tipo β -carbolina en un 0.9%, como la *gambirtanina*, *dihidrogambirtanina*, *hirsutita*, oxíndoles tetracíclicos (*rinchofilina*, *isorinchofilina*) y pentacíclicos (*mitrafilina*, *isomitrafilina*, *isopteropodina*, *pteropodina* y *uncarinas*). Y taninos catéquicos (20-50%) como la *gambirinas A1* y *A3*; triterpenos, heterósidos del ácido quinóvico y esteroides. Gonçalves et al., (2005) confirmaron así mismo la presencia de *Ácido Protocatecuico* además de otros compuestos como *catequina*, *epicatequina*, *ácido vanílico*, *ácido cafeico* y *ácido siríngico* en esta planta.

Mentha piperita (Menta).

Planta medicinal digestiva, de la Familia *Lamiaceae* (Labiadas). Tradicionalmente la menta se administra en forma de tisana que favorece las funciones digestivas del estómago, excitando la producción de jugo gástrico. En Medicina Tradicional el aceite de menta se utiliza como analgésico, calmante, refrescante, es útil en el tratamiento de los problemas de la piel, la fiebre y los dolores de muelas, de cabeza y migrañas; es utilizado también como antibacteriano. Inhalado se usa para aliviar la congestión nasal. Sus usos son numerosos, la infusión en compresas se usa para refrescar las articulaciones inflamadas, el reumatismo y la neuralgia. La infusión de hojas se emplea como espasmolítico, carminativo, antiemético, diaforético, analgésico, antiséptico, antiespasmódico, tónico digestivo, estimulante, colagogo, relajante de los vasos sanguíneos periféricos,... Se usa también para promover el flujo biliar,



relajar los músculos del tracto digestivo, reducir las náuseas y mareos durante los viajes, estimular la secreción de los tubos digestivos... La menta contiene *Mentol* libre (43%, Mucciarelli et al., 2001), y combinado con *ácido acético* y *valeriánico*, principios muy usados en la industria química. También posee *mentona* (8-20%), *mentenonas*, *cineol*, *piperitona*, *menteno* y otros terpenos (Font Quer, 1978). Además posee un 24% de *Pulegona* y un 2.57% de *Limoneno* (Mucciarelli et al., 2001).

En la planta encontramos flavonoides como el *xantomicrool*, *gardenina D*, *glucósidos de Apigenina*, *diosmetina*, *rutina* y *luteolina*; ácidos fenólicos derivados del ácido cinámico como el *ácido rosmarínico*; y triterpenos como la *α-aminina* (Carretero, 2000). Junto al aceite esencial que se considera el principio activo, la hoja contiene además triterpenos, carotenoides y flavonoides; algunas son *flavonas* altamente oxigenadas (Jullien et al., 1984). La composición y variación de su aceite esencial han sido objeto de centenares de publicaciones. Según Gilly et al. (1986), el componente mayoritario es siempre el *Mentol* de un 30-40 %, acompañado de *mentona* (15-25 % en la Mitcham, y 50 % en la menta blanca); también se encuentran la *isomentona*, *neomentol*, *cineol*, *mentofurano*, *germacreno D* y otros *hidrocarburos*.

Mentha pulegium (Poleo).

Planta medicinal digestiva, de la Familia Lamiaceae (Labiadas). Los usos tradicionales que se le ha dado al Poleo son parecidos a los de la menta: para aliviar digestiones difíciles y para aumentar los movimientos peristálticos del intestino, como tónico estomacal que facilita las digestiones y es eficaz contra los dolores intestinales de cualquier tipo. Su nombre latino *pulex* (= pulga) indica la capacidad que posee de matar las pulgas cuando fumigamos con él un lugar cerrado. Esta tisana es útil contra las lombrices intestinales. Se utiliza como un suave tónico digestivo; la infusión de poleo aumenta la secreción de jugos gástricos y ayuda a expulsar los gases intestinales, además calma la tos y facilita la expectoración (Font Quer, 1978).

Posee un 0.1 % de *Mentol* y de *Limoneno* y un 69.8% de *Pulegona* (Mucciarelli et al., 2001). Entre los componentes del aceite esencial (0.5-2.0 %) están: Monoterpenos como la *Pulegona* (60-90%); *mentona* (10-20%), *isomentona* (2-10%), *peperitenona*, *acetato de neoisomentilo*, *taninos*, y *flavonoides* como la *diosmina* y *hesperidina* (PDR for Herbal Medicines, 2000).



Tilia cordata (Tila).

Planta medicinal hipnótica y sedante; de la Familia de las Tiliáceas. Las flores del tilo se recogen a mano cuando se acaban de abrir, no sirven las marchitas ni las que aún no se han abierto. La tila tiene propiedades curativas sedantes, disminuye la acidez del estómago tomada al final de las comidas. También se usa para resfriados y dolores de cabeza; y fortalece el sistema inmunitario. La corteza del tilo, mascada y puesta en forma de emplasto, suelda las heridas frescas. Sus hojas, mojadas, resuelven las hinchazones, hacen renacer los cabellos e impiden que es caigan. Calma la excitación nerviosa, actúa como antiespasmódica, diurético, anticatarral, emoliente y estomacal. Las flores contienen pequeñas cantidades de Mucílago, materias tánicas, azúcares, *hesperidina*, grasa, *L-fitosterina*, un hidrocarburo y 0.038% de esencia de flor de tilo, que contiene farnesol, un alcohol sesquiterpénico de la serie alifática (Font Quer, 1978).

De entre los flavonoides (1%) encontramos *astragalina*, *kenferitrina*, *afzelina*, *quercitrina*, *isoquercitrina*, *rutina*, *hiperósido*, *heterósidos de kenferol* y *astragalina* (tilirósidos). También existen polisacáridos heterogéneos en forma de mucílagos (3-10%) como el *arabinogalactano*. Su aceite esencial (0.01-0.02 %) contiene monoterpenos como el *linalol*, *geraniol*, *eucaliptol*; sesquiterpenos, como el *D-germacreno*; hidrocarburos como el *2-fenil-etanol*, *fenil-etil-éter*, y ácidos fenólicos derivados del ácido cinámico como el *ácido cafeico*, *clorogénico* y *p-cumárico*, además encontramos taninos catéquinos en un 2 % (Blumenthal et al., 2000). El *Limoneno* también se encuentra en esta planta en bajas cantidades (Manuele et al., 2008), así como la *Quercitina*, que es de los fenoles más abundantes en vegetales (Prasain et al, 2004).

Valeriana officinalis (Valeriana).

Planta medicinal de la familia Valerianaceae. La gran demanda que ha experimentado la Valeriana ha inducido a su cultivo industrial con el fin de cubrir las necesidades del mercado; hoy en día sus preparaciones se encuentran en todas las farmacias. Se utiliza como calmante de estados nerviosos, tiene acción sedante e inductora del sueño, según la dosis empleada, calmando los estados de excitación nerviosa. También es expectorante, diurético, carminativo, analgésico, reduce la presión sanguínea, fortalece el corazón y estimula la producción de leche. Las compresas se emplean para aliviar los calambres musculares. La decocción de la raíz se usa como antiespasmódico, sedante, para tratar la epilepsia, el insomnio, y la jaqueca.



Aplicada externamente se emplea para el tratamiento de heridas y llagas de la piel y en las contracciones musculares (Font Quer, 1978).

Los principios activos de la Valeriana son de dos tipos: i) ésteres de ácido valerénico e *isovaleriánico* con alcoholes como el *borneol* y *eugenol*; también aparecen *sesquiterpenos* como *valerenal*, *valerenona* y *valerianol*; ii) iridoideas, conocidos como *valepotriatos*. Estos compuestos pueden tener un enlace doble (dihidrovaltrato) o dos dobles enlaces. Los *valepotriatos* son compuestos muy inestables y se descomponen por calor, humedad y pH ácido, dando lugar a aldehídos deshidratados, conocidos como *baldrinales*: *baldrinal*, *homobaldrinal* y *valtroxal* (Carretero, 2000). La composición relativa de estas moléculas en los aceites puede variar con la estación y el año de recolección (Bos et al., 1998 b).

Sus cualidades se derivan principalmente de la esencia que se obtiene de la cepa y de las raíces; en estas partes de la planta se acumulan diversos ácidos, principalmente el llamado *isopropilacético* o *valeriánico*, o bien ésteres como el *isovalerianato de bornilo* al cual se le atribuye la acción terapéutica de la Valeriana, se encuentra en el rizoma y en las raíces de la planta recién arrancados. A medida que se van secando el *isovalerianato* se descompone y el *ácido valeriánico* queda libre. En la esencia encontramos además *canfeno*, *pineno*, *limoneno*, *levógiros*, y *borneol* (combinado con el ácido isovaleriánico); y dos alcaloides propios de esta planta: *catinina* y *Valeriana* (Font Quer, 1978). Además se han aislado numerosos componentes de la planta: glúcidos, ácidos grasos, ácidos fenoles, ácidos de cadena corta, alcaloides, aminoácidos, GABA, flavonoides, aceite esencial con carburos como mono y sesquiterpénicos, ricos en ésteres del borneol (Houghton, 1988; Janot et al., 1979).

1.8.1. Bioactividad de las plantas medicinales a estudio

Matricaria chamomilla es conocida porque aumenta la producción de jugos gastrointestinales, favoreciendo las digestiones; produce una relajación del músculo liso, siendo antiinflamatoria y antioxidante. Se ha comprobado que extractos acuosos de esta planta son antioxidantes y antiinflamatorios (alta actividad antilipooxigenasa), aunque no son capaces de inhibir la proliferación de células de melanoma de ratón. Estas propiedades antioxidantes y antiinflamatorias están correlacionadas con el contenido en *fenoles* totales, aunque esta planta no es de las que más alto contenido posee (Trouillas et al., 2003; Miliuskas et al., 2004). El aceite esencial de la *M. chamomilla* es antígenotóxico en el sistema de intercambio de cromátidas hermanas (Hernández-Ceruelos et al., 2002).



Uncaria tomentosa posee múltiples efectos sobre la salud. No sólo exhibe actividad antiinflamatoria, sino antiviral, inmunoestimulante, antimutagénica y antioxidante (Keplinger, 1982; Cerri et al., 1988; Aquino et al., 1989; Aquino et al., 1991; Rizzi et al., 1993; Desmarchelier et al., 1997) e inhibe la proliferación de células cancerosas de mama (Riva et al., 2001; Sheng et al., 2000 b). Los extractos acuosos de *U. tomentosa* inducen apoptosis en células de leucemia (Sheng et al., 1998), aceleran la recuperación de los glóbulos blancos (Sheng et al., 2000 a) y potencian la reparación de ADN de cadena simple y doble (Sheng et al., 2000 b). Parece ser que *U. tomentosa* media su efecto antiinflamatorio a través de la inhibición del *factor NF- κ B* y por tanto la síntesis de la citokina proinflamatoria *TNF α* (Valerio y Gonzales, 2005).

Los extractos de alcaloides de la planta (fundamentalmente *pteropodina* e *isopteropodina*) potencian la actividad fagocítica de los granulocitos (Wagner et al., 1985). La actividad antiviral de *U. tomentosa* es debida a al menos 6 glucósidos del *ácido quinóvico* (Aquino et al., 1989). Estos autores también demostraron que la actividad antiinflamatoria puede deberse en parte (33%) a uno de estos *glucósidos del ácido quinóvico* (Aquino et al., 1991). Aunque es muy probable que la actividad antiinflamatoria total se deba a varios compuestos que actúen sinérgicamente.

En comparación con otros extractos de frutas, verduras, cereales y plantas medicinales, los extractos acuosos y etanólicos de *Uncaria* han resultado tener una alta capacidad antioxidante (Pilarski et al, 2006).

El extracto seco de *U. tomentosa*, que contiene dosis de 6 mg. de alcaloides oxindólicos/ gr, aumenta la producción de interleucinas 1 y 6 (IL-1 y IL-6) en ensayos *in vitro* con macrófagos alveolares. Los *alcaloides oxindólicos pentacíclicos* inducen la liberación del factor regulador de la proliferación de linfocitos en células endoteliales humanas (Carretero, 2001). Estos mismos *alcaloides oxindólicos pentacíclicos* son los responsables de la estimulación de proliferación de líneas celulares linfoblastoides (Keplinger et al., 1999) y también podrían ser la causa de la débil toxicidad observada en ratas y humanos por estos mismos autores, aunque este hecho no se contempla como una desventaja. Stupper et al. (1993) han detectado *in vitro* actividad antileucémica de varios de estos *alcaloides oxindólicos*, siendo la *uncarina* el más activo.

Algunas propiedades terapéuticas de la planta también se pueden atribuir a sus fenoles, flavonoides *catequinas tanínicas* (incluyendo cis-epicatequina) y *procianidinas* en la corteza (Montenegro et al., 1976).



Mentha piperita, de venta libre, desde hace mucho tiempo, se utiliza ampliamente en infusión como “bebida higiénica y placentera” para “facilitar la digestión”. Bajo sus diferentes formas, la *mentha* está indicada en el tratamiento sintomático de los trastornos digestivos menores: digestiones lentas, acumulación de gases, flatulencias, etc., y como colerético. Los extractos tienen efectos antivirales (Newton et al., 2002).

El aceite esencial de la *mentha* aumenta la producción de jugos gastro-intestinales, favoreciendo la digestión ya que produce una relajación del músculo liso gastrointestinal (antiespasmódico) y muestra propiedades sedantes (Carretero, 2000), es citotóxico para linfocitos humanos, induce débilmente intercambios de cromátidas hermanas y es genotóxico en el test S.M.A.R.T. de *D. melanogaster* (Lazutka et al, 2001). Aunque se han podido dar casos excepcionales de intoxicación (Augiseau et al., 1987), la infusión carece de toxicidad, lo que no ocurre con el aceite esencial y sus componentes cuya prolongada administración (1 mes) induce en rata modificaciones histopatológicas a nivel del encéfalo, debidas sin duda a la *pulegona* (Thorup et al., 1983).

Por otro lado algunas investigaciones mostraron la capacidad quimiopreventiva, antimutagénica y anti cancerígena de *M. piperita* (Samarth et al., 2006; Samarth y Kumar, 2003; Samman et al., 1998).

Existen estudios que mostraron que la *M. piperita* tiene un efecto citotóxico sobre ratas (Inoue et al., 2001). El decreciente peso del feto en los grupos experimentales tratados puede deberse al bloqueo del crecimiento celular, que puede ser debido a efectos genotóxicos de esta hierba (Golalipour et al., 2008).

Mentha pulegium excita la secreción gástrica y está demostrado que aumenta la producción de jugos gastrointestinales, favoreciendo la digestión. Es antiespasmódica, produce una relajación del músculo liso; aumenta la producción y la eliminación de bilis; y produce una depresión del Sistema Nervioso Central, disminuyendo el período de inducción del sueño (PDR for Herb. Med., 2000). El aceite esencial no es mutagénico en el test S.M.A.R.T. (Franzios et al, 1997 y Karpouhtsis, et al 1998) y además los extractos etanólicos de *M. pulegium* poseen actividad antioxidante in vivo y puede emplearse en la protección de tejidos frente al estrés oxidativo (Jain et al., 2012). También los extractos metanólicos de la planta exhiben actividad antioxidante y efectos anti-genotóxicos en el sistema (SCE) de intercambio de cromátidas hermanas en linfocitos humanos (Alpsoy et al., 2011).



Tilia cordata produce depresión del Sistema Nervioso Central, disminuyendo el período de inducción del sueño. Soluciones acuosas de *T. argentea* protegen de la oxidación del *ácido linoleico* (Yildirim et al., 2000) y los extractos de tila tienen elevada actividad citotóxica frente a células de leucemia de ratón (Goun et al., 2002).

Valeriana officinalis tiene actividad sobre el Sistema Nervioso Central. Se sabe desde hace tiempo que el extracto acuoso de la droga reduce de forma significativa el tiempo de conciliación del sueño (Leathwood y Chauffard, 1985) y además se observa una mejora de la calidad del mismo (Leathwood y Chauffard, 1983). La Valeriana produce una relajación del músculo liso (actividad antiespasmódica) (Carretero, 2000).

Sin embargo, la Valeriana ha resultado genotóxica para el test de micronúcleos de ratón y causa aberraciones cromosómicas en la línea germinal de machos de esta especie; estas modificaciones genéticas y epigenéticas se adscriben a los valepotriatos y flavonoides presentes en la Valeriana (Al-Majed et al.; 2006). Los extractos con *diclorometano* de *valeriana* tienen efectos genotóxicos sobre el ADN de líneas celulares endoteliales humanas, cuando se ensayan altas concentraciones. Además las *vitaminas C y E* podrían tener un efecto bifásico sobre esta actividad, reduciéndola a bajas concentraciones, pero potenciándola a altas concentraciones (Hui-lian, et al., 2003). Los *valepotriatos* contenidos en la Valeriana son citotóxicos e inhiben la síntesis de ADN (Bounthan et al., 1981). El *valtrato* es muy tóxico sobre las células de hepatomas de rata. *In vivo*, el *dihidrovaltrato* (40 mg/Kg, ratón, i.p.) provoca una regresión en un 54 % del tumor ascítico Krebs II (Anton et al., 1986).

1.9. Fenoles contenidos en las Plantas

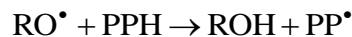
Los fenoles participan a distintos niveles en los mecanismos de inhibición de mutagénesis y carcinogénesis. Los polifenoles no son nutrientes, pero sus propiedades antioxidantes, antimutagénicas, antiestrogénicas, anticancerígenas y antiinflamatorias son potencialmente beneficiosas en prevención de enfermedades y en protección de la estabilidad genómica. Aunque los polifenoles pueden influir en la digestibilidad de proteínas, hay razones para creer que una subnutrición, es decir una ingesta abundante de fenoles, puede tener efectos beneficiosos en la estabilidad genómica (Hursting y Kari, 1999). Aunque no todos los polifenoles poseen efectos beneficiosos en los seres vivos, en general, los polifenoles son considerados agentes antioxidantes y antimutagénicos.



Se proponen un número de diferentes mecanismos para explicar los efectos antimutagénicos de los polifenoles. Algunos no son específicos, como por ejemplo, inhibiendo la ingesta de mutágenos, regulando positivamente la actividad de la glutatión S-transferasa, interfiriendo en la formación de aductos de ADN, inhibiendo la reacción de nitrosación, inhibiendo la activación de promutágenos o carcinógenos por la *Fase I*, induciendo rutas de detoxificación de la *Fase I* y de la conjugación de la *Fase II* acelerando la descomposición de metabolitos reactivos, capturando electrofílicos bien químicamente o por conjugación catalizada enzimáticamente o secuestrando EROs (Ferguson, 2001).

Otros más específicos sugieren que los polifenoles pueden tener efectos sobre la síntesis de ADN, reduciéndola. También son considerados como bioantimutágenos modificando la replicación y/o la reparación de ADN después de haber sido dañado por mutágenos; por ejemplo la vanillina potencia la respuesta SOS (Takahashi et al., 1990 y Watanabe et al., 1990). Los polifenoles complejos absorben mutágenos hidrofóbicos (Ferguson y Harris, 1998). Aunque algunos polifenoles potencian la nitrosilación, otros parecen inhibir este proceso, posiblemente interaccionando directamente con el mutágeno (Gichner et al., 1987).

Una de las mayores vías por la que los polifenoles son antimutagénicos es por su protección frente al daño oxidativo, tanto de la peroxidación lipídica, como del daño oxidativo directo al ADN. La mayor actividad antioxidante de los polifenoles proviene de la capacidad para secuestrar radicales libres, aunque también pueden inducir enzimas antioxidantes o inhibir las del citocromo P-450, como la ciclooxigenasa o la lipooxigenasa. Los polifenoles interfieren con la peroxidación lipídica y otras moléculas mediante una rápida donación de un átomo de hidrógeno a los radicales.



Los radicales fenoxi son relativamente estables y actúan como aceptores finales o "terminators" reaccionando con otros radicales libres:



Los polifenoles tienen efectos antiinflamatorios inhibiendo la ruta de síntesis del óxido nítrico que es producido en exceso en inflamaciones crónicas. Los polifenoles inducen apoptosis en función de la concentración, estructura y tipo celular en el que se prueben (Sakaguchi et al., 1998). Es importante para el hombre saber qué polifenoles y a qué dosis son beneficiosos para qué tipo de enfermedad: como antioxidantes en enfermedades



degenerativas o como protectores del daño genético, y esto, a pesar de los miles de trabajos que se publican, no está determinado aún.

Los fenoles son metabolitos secundarios de las plantas, representando los compuestos fitoquímicos esenciales de las verduras y frutas (Bravo, 1998; Ferguson, 2001). Los fenoles se conocían antes como antinutrientes, vista su capacidad de reducir la digestión de las proteínas e inducir un aumento de la excreción de los compuestos nitrogenados (Longstaff and McNabb, 1991). Pero, es gracias a esta propiedad por lo que los fenoles tienen una acción antioxidante que les confiere la capacidad de inactivar varias enzimas: hidrolasas, isomerasas, oxigenasas, oxidoreductasas, polimerasas, fosfatasas, fosfoquinasas y aminoacidooxidasas. Los fenoles actúan como antioxidantes inhibiendo los radicales libres. Además inhiben la iniciación, la promoción y la progresión de los tumores, bloquean la formación de sustancias químicas en el estómago y reducen la disponibilidad de benzopirenos en el intestino. Protegen el ADN, las membranas lipídicas y en general a todas las moléculas biológicas del daño oxidativo, reforzando así el sistema inmunitario, y según su estructura química actúan por varios mecanismos.

Las propiedades de muchos de los componentes de las plantas medicinales que hemos seleccionado para este estudio son conocidas. Algunos de ellos pertenecen al grupo de los *terpenos*, que son un grupo importante de componentes vegetales de origen biosintético común; todos proceden de la condensación, en número variable, de unidades isoprénicas.

1.9.1. Fenoles representativos de las plantas medicinales estudiadas

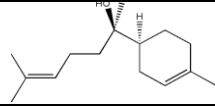
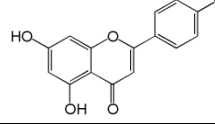
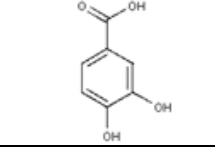
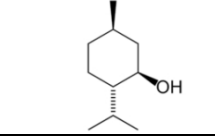
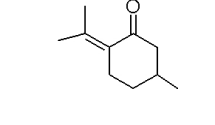
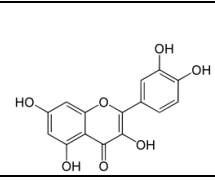
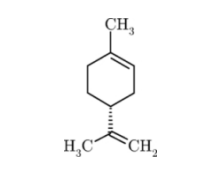
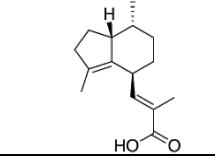
Entre los antioxidantes fenólicos naturales, la familia flavonoide es la más importante. Un número de estudios *in vivo* han establecido la jerarquía de los flavonoides en cuanto a su actividad antioxidante (Cos et al., 1998; Rice-Evans et al., 1996) y las correspondientes relaciones estructura-actividad. Se ha demostrado claramente que el anillo B es el principal lugar de transferencia de hidrógeno y, como consecuencia, de la capacidad antioxidante. Esto es particularmente cierto cuando el anillo B es una porción catecol, como en el flavonol *quercitina*. En contraste, el anillo A parece ser menos importante. El doble enlace 2,3 también contribuye a la actividad antioxidante, ya que asegura la deslocalización de electrones entre los anillos B-C, lo cual contribuye a la estabilización de radicales -RO, desde la pérdida de



hidrógeno. Un tema importante ha sido debatir el papel del grupo 3-OH; estudios *in vitro* han demostrado que este grupo contribuye al potencial antioxidante (van Acket et al., 1996).

Con el fin de conocer si podemos atribuir la capacidad desmutagenica o anticancerígena que observamos en las plantas seleccionadas a algunos de sus componentes fenólicos analizados, para nuestro estudio de toxicidad, genotoxicidad, antigenotoxicidad y citotoxicidad elegimos 8 de los fenoles contenidos en ellas. Estos aparecen en la tabla 1.1 y son componentes bioactivos principales, y en algunos casos mayoritarios, de tales plantas medicinales.



Tabla 1.1. Componentes fenólicos de las plantas medicinales que sometimos a estudio.				
Fenol	Grupo Químico	Fórmula	Propiedades	Distribución en planta (ppm)
Bisabolol	Alcohol sesquiterpeno monocíclico.		Antiirritante, antiinflamatorio y antimicrobiano.	<i>M. chamomilla</i> ⁽²⁾ 725-10000 ⁽¹⁾ <i>V. officinalis</i> ⁽³⁾
Apigenina	Flavonoide ansiolítico.		Ansiolítico y antiproliferativo celular bajo la acción de estrógenos.	<i>M. chamomilla</i> ⁽²⁾ 6-8400 ⁽¹⁾
Ácido Protocatecuico	Ácido carboxílico aromático. Ácido benzoico.		Usado para preservar los alimentos como antimicrobiano.	<i>U. tomentosa</i> ⁽⁴⁾ <i>M. chamomilla</i> ⁽⁵⁾
Mentol	Alcohol secundario saturado.		Antiséptico intestinal, anestésico y descongestivo.	<i>M. piperita</i> ⁽⁶⁾ 570-22800 ⁽¹⁾ <i>M. pulegium</i> ⁽⁶⁾ 37800 ⁽¹⁾
Pulegona	Monoterpeno cetona.		Hepatotóxico y efecto abortivo	<i>M. piperita</i> ⁽⁶⁾ 0-440 ⁽¹⁾ <i>M. pulegium</i> ⁽⁶⁾ 520-18800 ⁽¹⁾
Quercitina	Flavonoide.		Antioxidante (prevención del cáncer) y antitumoral. Antiviral y antialérgica.	<i>T. cordata</i> ⁽⁷⁾
Limoneno	Terpeno		Disolvente biodegradable. Con efectos anticancerígenos.	<i>M. piperita</i> ⁽⁶⁾ 160-1590 ⁽¹⁾ <i>M. pulegium</i> ⁽⁶⁾ 10-2200 ⁽¹⁾ <i>T. cordata</i> ⁽⁸⁾ <i>V. officinalis</i> ⁽⁹⁾
Ácido Valerénico	Sesquiterpenoide		Antiespasmódico	<i>V. officinalis</i> ⁽¹⁰⁾

(1) Tomado de PAEDBs. (2) Font Quer, 1978. (3)Safaralie et al., 2008. (4)Gonçalves et al., 2005. (5) Kováčik et al., 2008. (6) Mucciarelli et al., 2001. (7) Prasain et al., 2004. (8) Manuele et al., 2008. (9) Samaneh et al., 2010. (10) Bos et al., 1998 (b).



1.9.2. Actividad genotóxica, antigenotóxica y citotóxica de los fenoles a estudio

La **Apigenina** es antiinflamatoria, estrogénica, citotóxica para células cancerosas, tumoricida e inhibe el crecimiento de fibroblastos y la agregación plaquetaria (Harborne y Williams, 2000), por lo que sus efectos son pleiotrópicos. Bloquea la proliferación de la línea celular HL-60 y otras como las eritroides (Ruela-de-Sousa et al., 2010). Este fenol inhibe significativamente la angiogénesis en tumores *in vivo* (Fang et al., 2007), la síntesis de ADN, la proliferación de las células cancerosas pancreáticas e induce una detención del ciclo celular en la fase G2/M (Ujiki et al., 2006). En general se sugiere que la inducción de apoptosis por la *Apigenina* se lleva a cabo mediante la caspasa 3 con liberación del citocromo c y la generación EROS, pudiendo ser la activación dependiente del número de grupos hidroxilo en el grupo 2-fenil y la existencia del grupo 3-hidroxilo (Wang et al., 1999). La *Apigenina* inhibe el desarrollo del tumor bloqueando el ciclo celular e induciendo la apoptosis mediante un mecanismo dependiente de p53 (Plaumann et al., 1996). Solamente en el trabajo de Duraj et al. (2005) no encuentran efectos apoptóticos de este alcaloide.

El **α -Bisabolol** es uno de los sesquiterpenos más importantes de *M. chamomilla*, representando casi el 50% de su composición fenólica total. Ejerce una actividad antioxidante moderada (Ruberto y Baratta, 2000), aunque reduce la inflamación y la artritis, previene el desarrollo de úlceras gástricas, es antibacteriano y antifúngico (Hernández-Ceruelos et al., 2002), protege de los daños gástricos de la aspirina (Kalinkova, 1999) e induce apoptosis en células de glioma de rata (Cavaliere et al., 2004). La inducción de apoptosis se lleva a cabo mediante el receptor Fas en la vía intrínseca (Gomes-Carneiro et al., 2005). Es antimutagénico en varios sistemas modelo y frente a diversos tipos de mutágeno. (Gomes-Carneiro et al., 2005).

El *Bisabolol* no es mutagénico e inhibe los efectos de la aflatoxina B1 y otros mutágenos indirectos en el test de Ames. Además *Bisabolol* es antimutágeno, al menos en parte, gracias a sus efectos inhibitorios de la actividad de algunas isoformas CYP (CYP1A y 2B subfamilia) implicadas en la activación de los promutágenos. La inhibición de las monooxigenasas del hígado puede ser la explicación de la mayoría de los efectos antimutágenos del *Bisabolol* (Gomes-Carneiro et al., 2005). La ausencia de genotoxicidad en el aceite de camomila también fue probada en el ensayo de micronúcleos en médula ósea de ratón (Alvarez-Gonzalez et al., 2006). Se ha mostrado recientemente que, este aceite rico en



Bisabolol, bloquea los cambios entre cromátidas hermanas SCE inducidos por dos genotoxinas que actúan directamente (daunorubicina y metilmetanosulfonato) en las células de la médula ósea de ratón (Hernández-Ceruelos et al., 2004).

El Ácido Protocatecuico (*Ácido 3,4-dihidroxibenzoico; DHBA*) está presente en varias frutas y verduras: olivo (Masella et al, 1999), arroz (Hudson et al., 2000), vid (Li et al., 1993) y en plantas medicinales (Liu et al., 1992). Este ácido presenta efectos biológicos contradictorios (Babich et al., 2002). Se ha mostrado en estudios con animales que es un anticarcinógeno que inhibe la carcinogénesis inducida por ciertos agentes químicos en el hígado (Tanaka et al., 1995), en el colon (Tanaka et al., 1994), en la cavidad oral (Ohnishi et al., 1997), en el estómago (Tanaka et al., 1995), en la vejiga urinaria (Hirose et al., 1995), en el páncreas (Nakamura et al., 2000, a) y en la piel (Tseng et al., 1998). Mientras que en otros estudios, el *DHBA* favorece la inducción química de la promoción del cáncer de piel (Nakamura et al., 2000, b) y no exhibió ningún efecto protector contra la carcinogénesis inducida por algunos agentes químicos en los pulmones (Mori et al., 1999). Induce apoptosis en las células tumorales (Babich et al., 2002). Asimismo, se describió que el *DHBA* aumenta la proliferación e inhibe la apoptosis de células madre neuronales (Guan et al., 2009). Además, se mostró que induce daño cromosómico en células de ovario de hamster Chino (Stich, 1991).

El *DHBA* inhibe a la vez, la peroxidación lipídica en la membrana plasmática de los hepatocitos de ratón, la hemólisis inducida por el Peróxido de Hidrógeno en los eritrocitos de ratón (Liu et al., 2002) y el daño oxidativo inducido por el tert-butilhidroperóxido (*t*-BHP) en los hepatocitos primarios de ratón (Tseng et al., 1996.). Aunque puede comportarse como un potente antioxidante biológico. El *DHBA* inhibe la oxidación de las proteínas humanas de baja densidad estimulada por el Cu^{2+} (Masella et al, 1999), la peroxidación del ácido linoléico (Yen y Hsieh, 2000), la auto-oxidación de Fe^{2+} (Yoshino y Murakami, 1998), y otros daños en el ADN (Lodovici et al., 2001; Ueda et al., 1996), en otros estudios el *DHBA*, según su concentración, exhibe actividades tanto antioxidante como prooxidante (Fukumoto y Mazza, 2000).

En los pocos estudios hechos sobre su toxicidad, se ha visto que el *DHBA* ejerce un efecto protector hepático *in vivo* contra el estrés oxidativo a concentraciones bajas (Liu et al., 2002) y también contra la deterioración diabética en ratones (Lin et al., 2009). Pero a concentraciones elevadas induce estrés oxidativo en células de leucemia humanas y en animales de laboratorio (Nakamura et al., 2001 a; Nakamura et al., 2001 b).



El *Mentol* es el componente más activo de la *mentha* (Taddei et al., 1988). Al igual que otros terpenos, el *Mentol* previene la formación de placas de ateroma, concretamente en conejos sometidos a un régimen enriquecido con *colesterol*, aumenta el colesterol de la fracción HDL pero, curiosamente, inhibe la *lecitin-colesterol-acetiltransferasa* (enzima implicada en el proceso del transporte de colesterol por HDL) (Cooney et al., 1979). Bernson y Pettersson (1983) sugirieron que el *Mentol* tenía un efecto sobre las membranas biológicas deteriorándolas. Se tienen datos de efectos mutagénicos del *Mentol* en el test del cometa con células de hámster chino (Kiffe et al., 2003), aunque en linfocitos humanos no se ha detectado inducción de intercambio de cromáticas hermanas por tratamientos con *Mentol* (Murthy et al., 1991) ni en diversas cepas de *Salmonella typhimurium* (Gomes-Carneiro et al., 1998). El *Mentol* es un fenol muy estudiado debido a su uso en cigarrillos y alimentación, por ello se sabe que es citotóxico para varios tipos de líneas tumorales (Lin et al., 2005; Lu et al., 2007; Eid et al., 2012; Kim et al., 2012). La aplicación vía tópica de los medicamentos reduce la toxicidad sistémica, la cual se vería limitada en su aplicabilidad debido a la permeabilidad restringida de esta tipo de aplicación de las drogas. A este respecto, Nagle et al. (2011) concluyeron que la mezcla de las drogas con el *Mentol* aumenta la penetración de estas en la piel. En relación a la posible toxicidad de esta molécula, hoy se sabe que es un terpeno con elevada actividad hemolítica causando lesiones celulares de manera dosis-dependiente (Mendanha et al., 2013).

La *Pulegona* es un monoterpeno cetona presente en algunas plantas medicinales como se ha visto, que ha sido usado para inducir la menstruación y provocar el aborto. Altas dosis de aceites esenciales de las plantas que la contienen generan daños hepáticos, toxicidad en el Sistema Nervioso Central, gastritis, toxicidad renal y pulmonar, y muerte en ratas (Thorup et al., 1983; Anderson et al., 1996), es hepatotóxica y neumotóxica en ratones (Gordon et al., 1982). Mendanha et al., (2013) encuentran que la *Pulegona* tiene efectos hemolíticos y citotóxicos sobre fibroblastos humanos.

La *Quercitina* entra en la categoría de sustancias que poseen un amplio rango de propiedades biológicas: mejora el riesgo cardiovascular inflamatorio y es la sustancia prototipo para usar en quimioprevención (Russo et al., 2012). Es el candidato más eficaz para actividades terapéuticas del edema renal, hipertensión arterial, la creatinina sérica, hematocrito, cardiopatías, calcificación de la aorta, amiloidosis glomerular, disminución de eritrocitos en la médula ósea, deposición de colágeno, expresión de TNF- α , inactivación de caspasa-3, I κ B α , PPAR α y de niveles séricos de insulina (Peng et al., 2012). La *Quercitina* es un potente antioxidante, pudiendo prevenir la oxidación del ADN, proteínas y lípidos (Makris y



Rossiter, 2001). Teicher et al. (1991) encontraron que la *Quercitina* (200 mg/kg) exhibía actividad antiangiogénica, ralentizando el flujo sanguíneo de tumores. Sin embargo, hace algunos años Dunnick y Hailey (1992) realizaron estudios de toxicidad y carcinogenicidad de *Quercitina* en ratas machos y hembras, encontrando para esta molécula actividad carcinógena en el riñón de la rata macho.

El d-Limoneno es un componente bioactivo de *M. piperita*, *M. pulegium* y *T. cordata* y es usado mundialmente como aroma en cosmética, bebidas, alimentos o goma de mascar. Posee propiedades quimiopreventivas (Crowell et al., 1992; Homburger et al., 1971; Maltzman et al., 1989; Wattenberg y Coccia, 1991), quimioterapéuticas (Elegbede et al., 1986 y Haag et al., 1992), antidiabéticas (Murali y Saravanan, 2012) e inmunorreguladoras (Lappas y Lappas, 2012), es ansiolítico para ratones (de Almeida et al., 2012) y alarga la vida de *D. melanogaster* (Fernández-Bedmar et al., 2011). Aunque puede causar hemolisis en roedores, produciendo lesiones celulares de manera dosis dependiente (Mendahna et al., 2013). Aunque el *Limoneno* no fue mutagénico en el Test de Ames con cuatro cepas de *Salmonella typhimurium* (TA98, TA100, TA1535 y TA1537) (Programa Nacional de Toxicología de 1990) ni en ratas (Turner et al., 2001), se consideró un carcinógeno no genotóxico (Tennant and Ashby, 1991). Sin embargo existen evidencias recientes de su potencial quimiopreventivo, ya que puede inhibir el crecimiento tumoral y la metástasis por la vía apoptótica Lu et al. (2004), inhibiendo el desarrollo de *foci* crípticos aberrantes (ACF) en colon de ratas Kawamori et al., (1996). Uedo et al. en 1999 ya concluyen que el *Limoneno* puede inhibir diversas etapas de la tumorigénesis en diversos modelos animales y estaría siendo evaluado como un agente quimiopreventivo en los seres humanos.

Los ácidos valerénicos (*Ácido Valerénico*, ácido acetoxivalerénico, ácido hidroxivalerénico y metil valerénico), que son característicos de *V. officinalis*, exhiben citotoxicidad moderada frente a células de cáncer de pulmón y de colon (Bos et al., 1998 a). De todos ellos, es concretamente el *Ácido Valerénico* el mayor responsable de la actividad sobre el cuerpo amigdaloides del cerebro inhibiendo la disminución de GABA que resulta en la sedación (Del Valle-Mojica et al., 2011).



1.10. Objetivo del presente trabajo

Los principios activos de las plantas constituyen aún hoy día la base de la mayoría de los fármacos y se vienen usando desde la antigüedad no sólo como alimento, sino en forma de infusión natural de la planta o de sus aceites esenciales con fines médicos. Además de las vitaminas y minerales presentes en las plantas, es la composición en flavonoides, fenoles, polifenoles o taninos lo que confiere a cada una la especificidad de su eficacia.

Aunque los organismos sean capaces de transformar sustancias naturales en xenobióticos, también existen un gran número de sustancias procedentes de plantas o de sus productos manufacturados que tienen elevados efectos antioxidantes y antiinflamatorios, y algunos de ellos exhiben actividad antipromotora de tumores en carcinogénesis experimental. Por ello, la evaluación genotoxicológica, antigenotoxicológica y citotóxica de las plantas medicinales seleccionadas debe llevarse a cabo relacionándola con otras para posicionar su valor relativo.

El objetivo general de nuestro trabajo será estudiar por primera vez, la relación entre el papel en la protección del material genético eucariota *in vivo* ejercido por plantas medicinales de uso mundial y su actividad anticarcinogénica en líneas celulares humanas.

Podemos resumir los objetivos específicos del presente trabajo como sigue:

- Evaluar genotoxicológicamente las infusiones de las plantas medicinales seleccionadas, así como sus fenoles más característicos, para establecer su inocuidad desde el punto de vista del daño genético.
- Evaluar antigenotoxicológicamente tales plantas medicinales y fenoles frente al Peróxido de Hidrógeno, como un potente mutágeno de tipo oxidativo para determinar su potencial preventivo en la defensa frente a agresiones oxidativas en el ADN.
- Estudiar su capacidad antiproliferativa frente la línea celular HL-60, tanto de las infusiones como de la planta completa, y de sus fenoles más significativos, para evaluar su posible uso en quimioprevención.



MATERIAL Y MÉTODOS





2. Materiales y Métodos

En este trabajo se han utilizado dos tipos de enfoques:

- Para el análisis de actividad genotóxica y antigenotóxica, el ensayo *in vivo* de mutaciones y recombinaciones somáticas (S.M.A.R.T.) en discos imaginales alares de *D. melanogaster*, descrito por Graf y colaboradores en 1984;
- Y para determinar la actividad citotóxica, el ensayo *in vitro* de inhibición del crecimiento tumoral en células sanguíneas de la leucemia humana HL-60 (ECACC/Sigma, Producto nº 98070106).

2.1. Ensayos en Sistema *in vivo* de evaluación del daño genético

En los ensayos S.M.A.R.T. se analiza la pérdida de heterocigosidad, como consecuencia de alteraciones genéticas producidas en células somáticas en mitosis expuestas a las sustancias a ensayar. Los tratamientos se realizan sobre larvas de *D. melanogaster* heterocigotas para algún marcador que, en homo o hemicigosis, produce un fenotipo distinguible en moscas adultas. Así, las alteraciones genéticas inducidas en las células larvarias se detectan, después de la expansión clonal y metamorfosis, como grupos de células mutantes en los tejidos adultos.

En el caso del ensayo de alas, la población celular que responde a la exposición es la que forma el disco imaginal del ala en las larvas de *D. melanogaster*, y los marcadores genéticos utilizados son *mwh* y *flr³*, mutaciones que en homocigosis producen un fenotipo distinguible al microscopio óptico en las alas de las moscas adultas.

La figura 2.1. presenta el protocolo básico a seguir para la realización del ensayo de mutación y recombinación somáticas en alas de *D. melanogaster*. En cada uno de los pasos se ha representado la dotación genética del cromosoma 3 ya que para este ensayo se utilizan dos estirpes de *D. melanogaster*, cada una de ellas con marcadores genéticos en el cromosoma 3. Ambas estirpes se cruzan y las larvas descendientes se tratan con la sustancia a ensayar. La población de larvas tratadas se compone de dos tipos de individuos (*mwh/Bd⁵* y *mwh/flr³*), que únicamente son distinguibles cuando emergen los adultos. Las moscas generalmente analizadas son las transheterocigotas *mwh/flr³*. En ellas se observa al microscopio óptico (400 aumentos) la aparición de grupos de células mutantes sobre la superficie del ala de fenotipo normal. Estos grupos de células mutantes o manchas pueden ser de fenotipo *múltiple wing*



hairs, *flare* ó bien estar formados por células adyacentes con ambos fenotipos, en cuyo caso se denominan manchas gemelas.

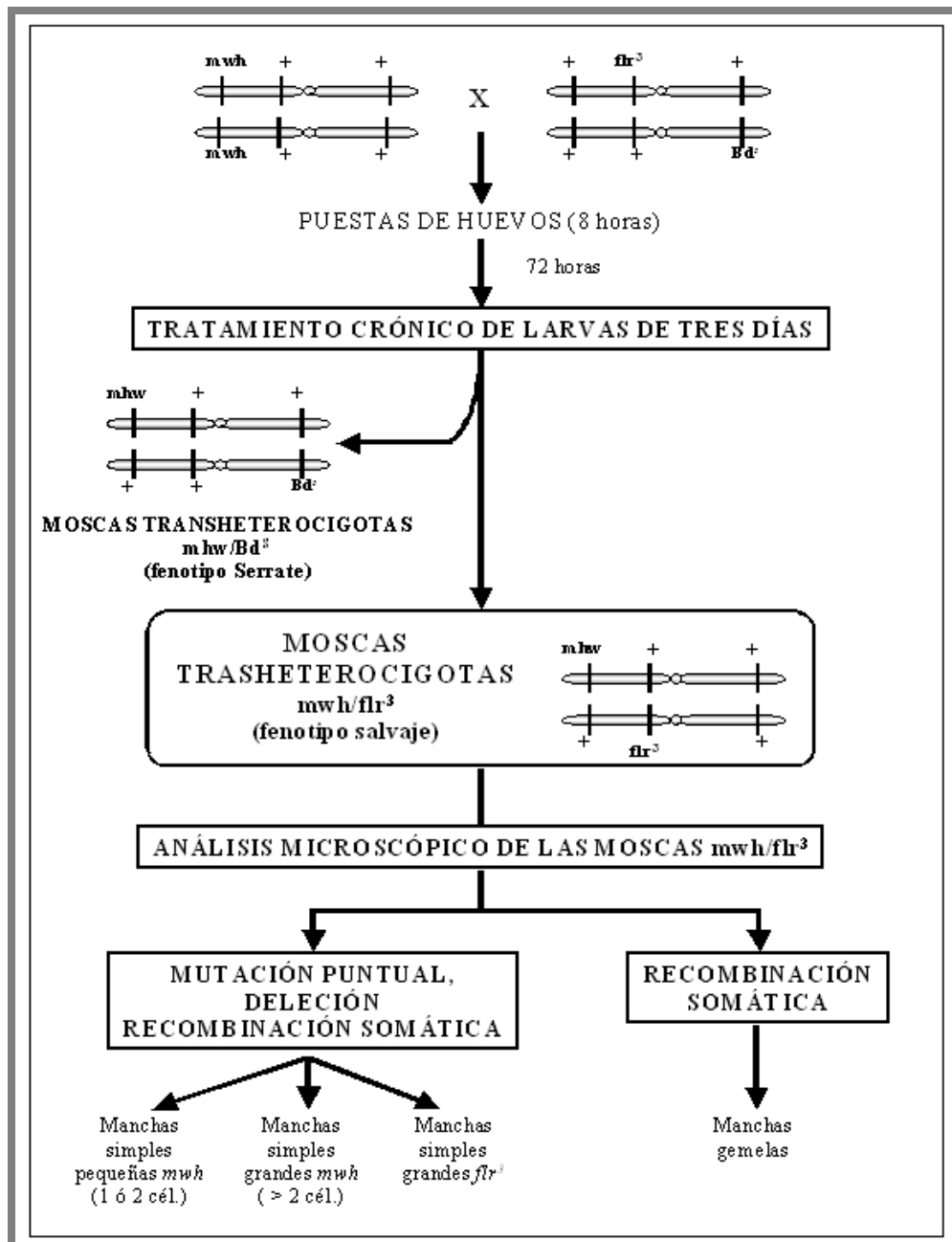


Figura 2.1. Esquema del protocolo a seguir en el ensayo de mutación y recombinación somática en alas de *D. melanogaster*.



En los diferentes apartados de este capítulo de materiales y métodos se describen en detalle cada uno de los pasos a seguir para la realización del ensayo de mutación y recombinación somáticas en alas, así como del ensayo de inhibición del crecimiento tumoral en células sanguíneas de la leucemia humana HL-60 (ECACC/Sigma, Producto nº 98070106).

Previamente haremos referencia a las principales características generales de *D. melanogaster*, y de las estirpes utilizadas, así como de los compuestos estudiados en este trabajo.

2.1.1. Estirpes utilizadas

En el presente trabajo de Tesis se han utilizado cuatro estirpes de *D. melanogaster*, cada una de las cuales presenta una o varias mutaciones en el cromosoma 3, que afectan al fenotipo del ala y que se utilizan como marcadores. Las cuatro estirpes utilizadas presentan la siguiente dotación génica en el cromosoma 3:

- *mwh/mwh*
- *flr³/In(3LR)TM3, ri p^o sep bx^{34e} e^s Bd^f*, abreviadamente *flr³/TM3, Bd^f*.
- *NORR/NORR; mwh/mwh*.
- *NORR/NORR; flr³/In(3LR)TM3, ri p^o sep bx^{34e} e^s Bd^f*

La mutación *mwh* (*múltiple wing hairs*) es recesiva y su manifestación fenotípica supone que cada célula del ala emite tres o más pelos o tricomas, en lugar del único pelo visible al microscopio óptico en las moscas de fenotipo salvaje (Yan et al., 2008).

La mutación *flr³* (*flare*) es recesiva y letal en homocigosis para los cigotos, pero no para las células somáticas. La expresión del fenotipo *flare* en las células somáticas es variable, desde pelos cortos, gruesos y puntiagudos, hasta pelos amorfos, a veces como secreciones de material melano-quitinoso de forma globular (Ren et al., 2007). Se conocen varios alelos del locus *flare*, denominados sucesivamente *flr*, *flr²*, *flr³*, siendo este último el que portan las cepas utilizadas en este estudio.

La mutación *Bd^f* (*Beaded-Serrate*) es dominante y afecta a la forma del borde del ala, confiriendo a ésta un fenotipo en forma de dientes de sierra, en lugar de la forma redondeada del fenotipo salvaje (figura 2.2.). Esta mutación se denominó inicialmente *Ser* (*Serrate*), y como tal aparece en las publicaciones relativas al ensayo S.M.A.R.T.. En este trabajo, sin



embargo, utilizaremos la actual denominación Bd^f , recogida por Lindsley y Zimm (1992). La mutación Bd^f es viable en homocigosis, aunque inicialmente se pensó que era letal en homocigosis y que la letalidad podía ser eliminada por recombinación. El letal recesivo estrechamente ligado persiste en muchos de los cromosomas que portan el alelo Bd^f , de manera que este alelo se comporta como letal en homocigosis (Lindsley y Zimm, 1992).

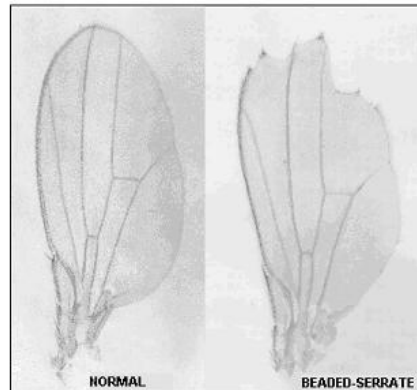


Figura 2.2. Fenotipo normal y *Beaded-Serrate*.
(Fotografías realizadas por García y Romero, 2004).

Por último, $TM3$ es una inversión múltiple, que impide el sobrecruzamiento natural en la zona que afecta. Tal y como se muestra en la figura 2.3., la inversión $TM3$ incluye inversiones paracéntricas en ambos brazos del cromosoma, así como una inversión pericéntrica.

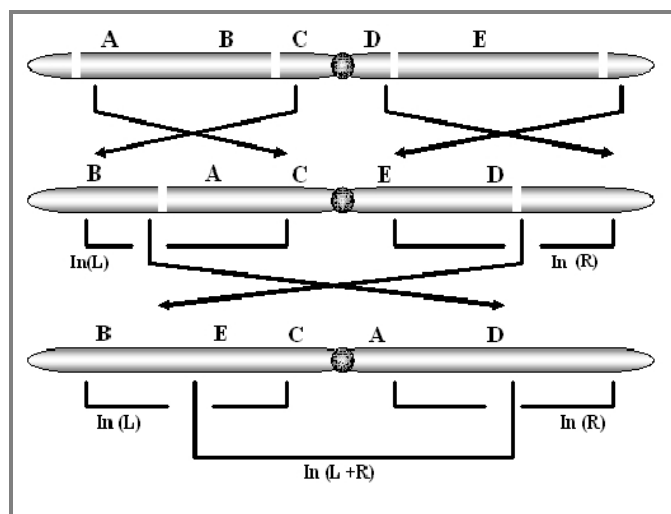


Figura 2.3. Representación de un cromosoma con una inversión pericéntrica L + R superpuesta sobre dos inversiones paracéntricas (L, R).



En la tabla 2.1. aparece la posición de los marcadores utilizados a lo largo del cromosoma 3. Tomado de Lindsley y Zimm (1992).

Tabla 2.1. Marcadores de las estirpes de <i>Drosophila</i> utilizadas en el ensayo de alas.		
Mutación	Localización	Descubridor
<i>mhw</i>	3 – 0.3	Di Pasquale (1951)
<i>flr³</i>	3 – 38.8	García-Bellido y Dapena (1974)
Centrómero	3 – 47.7	
<i>Bd^S</i>	3 – 91.9	Spencer (1939)

La estirpe *flr³/TM3*, *Bd^S* es transheterocigota, de manera que la inversión evita la posibilidad de que los marcadores puedan aparecer en posición cis. El hecho de que las mutaciones sean letales en homocigosis permite el mantenimiento de la heterocigosidad de la cepa, puesto que los individuos homocigotos para cualquiera de las dos mutaciones mueren (figura 2.4.).

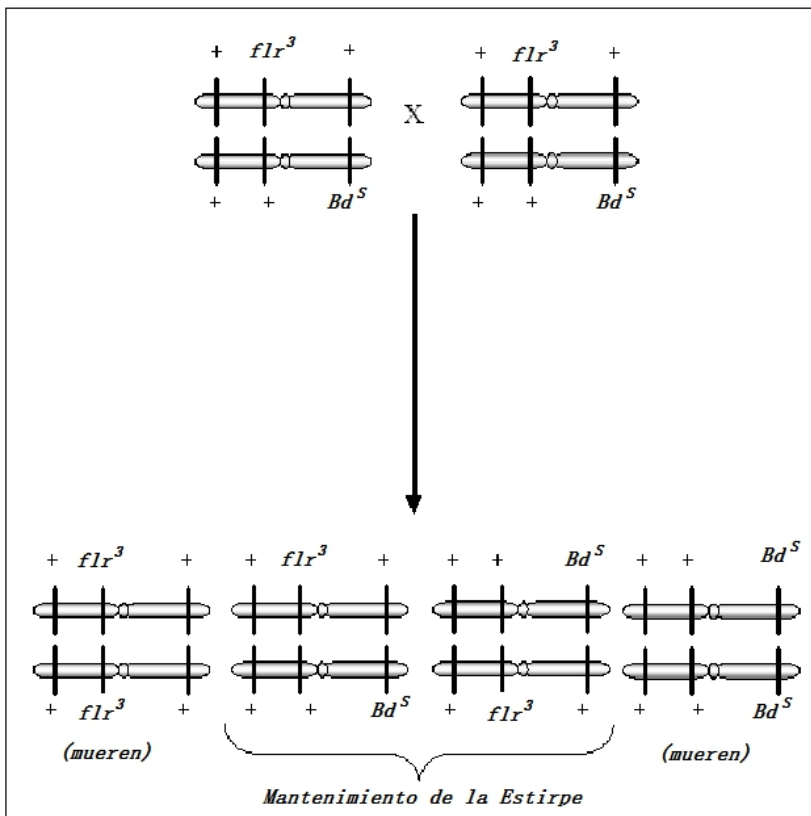


Figura 2.4. Mantenimiento de la estirpe *flr³ / TM3, Bd^S* (se muestra el cromosoma 3).



2.1.2. Mantenimiento de las estirpes

Las estirpes utilizadas para los experimentos se mantienen en el laboratorio mediante cambios en días alternos en frascos de vidrio, alimentándolas con medio de cultivo casero. Para la preparación del medio casero ponemos a calentar 900 ml de agua con el cloruro sódico (0.5 g). Cuando esté caliente se añade el agar (previamente disuelto en 100 ml de agua). Se remueve hasta que rompa a hervir, momento en el que se añaden la levadura (100 g) y el azúcar (25 g). La mezcla se hierve durante unos 5 minutos. Se deja enfriar hasta 55 °C y se añaden el ácido propiónico (5 ml) y el sulfato de estreptomicina (3.5 ml) de una solución al 0.2 %. Una vez finalizada la cocción y antes de que el medio solidifique se vierte en los botes una pequeña cantidad. Esto permite tener una batería de frascos en los que tenemos moscas en cada uno de los diferentes estadios de desarrollo, siendo posible en cualquier momento obtener hembras vírgenes de alguno de los botes (ver más adelante).

2.1.3. Manejo de los adultos

La transferencia de las moscas de un frasco a otro para el mantenimiento de las estirpes se realiza directamente, volcando el bote y vaciando su contenido sobre el frasco con medio fresco. Sin embargo, a veces se necesita inspeccionar el fenotipo de las moscas, o separar machos y hembras. Entonces es necesario anestesiarse las moscas, bien con éter etílico o con CO₂. En nuestro caso, hemos utilizado CO₂.

2.1.4. Obtención de hembras vírgenes

Para realizar cruzamientos entre individuos de diferentes estirpes, debemos asegurarnos de que las hembras utilizadas son vírgenes. Las hembras de *D. melanogaster* son sexualmente maduras al cabo de unas 8 horas desde la eclosión, por lo que para el aislamiento de hembras vírgenes se procede de la siguiente forma:

Entre la batería de botes disponibles, se seleccionan aquellos en los que haya pupas oscuras (a punto de eclosionar). Se vacían los botes de adultos, asegurándose que no queda ninguno en el interior. Se incuban los frascos a 25°C y, al cabo de 5 ó 6 horas, se anestesian las moscas que hayan emergido, se separan por sexos, almacenándose las hembras (que serán vírgenes) en un bote con medio fresco y descartando los machos.



2.1.5. Realización de los cruces

Los cruzamientos se realizan con 100-200 hembras vírgenes y unos 70-120 machos (ya que un macho puede fecundar varias hembras). Para obtener suficiente número de huevos, tanto hembras como machos no deben ser excesivamente jóvenes. Normalmente se realizan los cruzamientos con moscas de al menos un día de edad y se mantienen 48 horas antes de iniciar la puesta de huevos. En este trabajo se han utilizado cuatro tipos de cruzamientos:

1º Cruzamiento estándar: ♀ *mwh/mwh* X ♂ *flr³/TM3, Bc^f*

2º Cruzamiento NORR: ♀ *NORR/NORR; mwh/mwh* X ♂ *NORR; flr³/TM3, Bc^f*

3º Cruzamiento estándar: ♀ *flr³/TM3, Bc^f* X ♂ *mwh/mwh*

4º Cruzamiento NORR: ♀ *NORR/NORR; flr³/TM3, Bc^f* X ♂ *NORR; mwh/mwh*

Según Campos (2003) no existe efecto parental para la expresión de los genes *mwh-flr³*, aconsejándose el uso indistinto de un cruce o el recíproco, pudiéndose seleccionar cualquiera de los dos cruces recíprocos, atendiendo solamente a criterios de operatividad del laboratorio, tanto en los cruces estándar como en los cruces NORR. Por tanto, solamente se hará referencia al tipo de bioactivación (estándar o NORR) a la hora de reflejar los resultados.

Las cepas utilizadas para el cruzamiento NORR fueron construidas por Rosana Pacella en el departamento de Genética de la Universidad de Witwatersrand (Sudáfrica), y se caracterizan por una elevada expresión constitutiva de enzimas implicados en el metabolismo de xenobióticos. El procedimiento seguido por Pacella para la construcción de estas cepas fue similar al de Frölich y Würigler (1989), quienes construyeron las cepas ORR, sustituyendo los cromosomas 1 y 2 de las cepas del cruzamiento estándar por los de una cepa seleccionada por su resistencia a DDT, en la que se da una alta expresión constitutiva de los enzimas microsomales implicados en el metabolismo de xenobióticos. Así, las cepas ORR también se denominan de alta bioactivación.

La principal desventaja de las cepas ORR era la aparición de un patrón de desarrollo distorsionado en las células del ala, responsable de la distribución de los tricomas en forma de remolinos. Esto dificultaba el análisis microscópico de las alas de las cepas de alta bioactivación desarrolladas por Frölich y Würigler (1989, 1991). Una parte del trabajo de tesis doctoral de Pacella (1992) fue localizar el gen responsable de la aparición de dicho patrón, denominado paisley (*ply*) y eliminarlo de la cepa resistente a DDT. Una vez localizado el gen *ply* en el cromosoma 2 y construida la nueva cepa resistente a DDT libre de este gen, Pacella



sustituyó los cromosomas 1 y 2 de las cepas estándar utilizadas en el ensayo S.M.A.R.T. por los de dicha cepa, construyendo así las cepas NORR, utilizadas en este trabajo. Estas cepas mantienen la alta capacidad de activación de xenobióticos, sin presentar las desventajas metodológicas propias de las cepas ORR. Estas cepas han sido validadas en diversos trabajos ensayando pesticidas (Osaba et al., 1999; 2002) y aditivos alimentarios (El Hamss et al., 1999).

2.1.6. Puesta de huevos

En todos los experimentos realizados en este trabajo se han utilizado larvas de tercer estadio. Para evitar diferencias de edad sustanciales en la población de larvas a tratar, se mantienen los parentales en botes de puesta de huevos durante 8 horas. Transcurrido este tiempo, se retiran los parentales, los cuales pueden utilizarse para nuevas puestas en días sucesivos. El tratamiento se realiza al cabo de tres días de la puesta de huevos. Ese día, las larvas se recogen a la hora intermedia de las 8 que duró la puesta, es decir, si la puesta de huevos se realizó de 9 de la mañana a 5 de la tarde, la recogida de las larvas será a la 1 de la tarde. De esta forma, la edad de las larvas tratadas es siempre de 3 días \pm 4 horas.

El medio utilizado para la puesta de huevos está formado por 20 g de levadura fresca y 5 ml de agua. Se cubre el fondo del bote con una capa de unos 2 cm de levadura fresca amasada con un poco de agua. Se pueden añadir las moscas inmediatamente, después de asegurarse que la superficie no está demasiado húmeda, evitando así que las moscas se queden pegadas.

2.1.7. Recolección de las larvas

El día en que se realiza el tratamiento hay que sacar previamente las larvas de los frascos de levadura en los que se han desarrollado. El método de extracción consiste básicamente en disolver la levadura y lavar.

Se utiliza NaCl al 20% para disolver la levadura. A medida que se disuelve la levadura del bote de puesta de huevos, se vierte la disolución en un embudo de decantación, donde se lavan las larvas añadiendo más NaCl 20%. Las larvas, a diferencia de la levadura, flotan sobre la solución de sal, por lo que se pueden eliminar todos los restos de levadura abriendo la llave del embudo. Después se añade agua del grifo y se recogen las larvas sobre una gasa. Este proceso debe ser rápido para evitar que el choque osmótico afecte a la viabilidad de las larvas.



2.1.8. Sustancias analizadas

2.1.8.1. Plantas Medicinales: Infusiones

- *Matricaria chamomilla* (Manzanilla). Envasada por Pompadour Ibérica S.A., Ctra. a Madrid km. 405, Polig. Ind. Las Atalayas, Parc. VIII, 03114 Alicante. R.S.I. 25.00381/A; presentada en bolsitas individuales, de un peso aproximado cada bolsita de 1.35 g (x 25= 33.75 g).
- *Uncaria tomentosa* (Uña de Gato). Elaborada por Sana Flor, Plantas Medicinales, de Santiveri; en comprimidos de 480 mg de la corteza de *U. tomentosa* (Uña de gato).D.T.F. José M^a Palies. Nº Reg. Lab. 23 P.M. Reg. D.G.F.P.S. nº 2273 P.M. 60 comprimidos por caja.
- *Mentha piperita* (Menta). Envasada por Herboristería "CORDOBESA", Hierbas y Plantas Medicinales (al peso).
- *Mentha pulegium* (Poleo). Envasada por Herboristería "CORDOBESA", Hierbas y Plantas Medicinales (al peso).
- *Tilia cordata* (Tila). Envasada por Pompadour Ibérica S.A., Ctra. a Madrid km. 405, Polig. Ind. Las Atalayas, Parc. VIII, 03114 Alicante. R.S.I. 25.00381/A; presentada en bolsitas individuales, de un peso aproximado cada bolsita de 1.20 g (x 25= 30.00 g).
- *Valeriana officinalis* (Valeriana). Envasada por Herboristería "CORDOBESA", Hierbas y Plantas Medicinales (al peso).

2.1.8.2. Sustancias simples

Como controles positivos se han seleccionado 2 compuestos (Sigma-Aldrich) cuya actividad genotóxica ha sido suficientemente demostrada anteriormente y que garantizan la eficacia del ensayo (Romero-Jiménez, et al., 2005). Estos compuestos son:

Tabla 2.2. Controles positivos seleccionados.				
Fenol (Fórmula)	Pm	Densidad	CAS-Nº	Casa Comercial
Etil carbamato (C ₃ H ₇ NO ₂)	89.09 g/mol		[51-79-6]	Fluka Chemie AG.
Peróxido de hidrógeno(H ₂ O ₂)	34.01 g/mol	1.11 g/ml	[7722-84-1]	Fluka Chemie. GmbH Sigma-Aldrich.



Además de estos compuestos usados como controles positivos, se analizaron los fenoles más característicos de las infusiones arriba mencionadas, algunos de los cuales son mayoritarios y están presentes en más de una de las plantas medicinales estudiadas.

En la tabla 2.3. mostramos los fenoles seleccionados para el presente estudio.

Fenol	Fórmula	Pm (g/mol)	Densidad (g/cm³)	CAS-Nº	Casa Comercial
<i>Apigenina</i>	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	270.23		[520-36-5]	Fluka Chemie AG.
<i>Bisabolol</i>	C ₁₅ H ₂₆ O	222.37	0.92	[515-69-5]	Fluka Chemie. GmbH Sigma-Aldrich.
<i>DHBA</i>	C ₇ H ₆ O ₄	154.12		[99-50-3]	Sigma Aldrich.
<i>Limoneno</i>	C ₁₀ H ₁₆	136.24	0.843	[5989-27-5]	Fluka Chemie. GmbH Sigma-Aldrich.
<i>Mentol</i>	C ₁₀ H ₂₀ O	156.27	0.890	[2216-51-5]	Fluka.
<i>Pulegona</i>	C ₁₀ H ₁₆ O	152.23	0.935	[89-82-7]	Fluka; Sigma Aldrich
<i>Quercitina</i>	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	302.236	1.799	[6151-25-3]	Riedel-de Haën
<i>Ác. Valerénico</i>	C ₁₅ H ₂₂ O ₂	234.34		[3569-10-6]	Sigma Aldrich.

2.1.9. Tratamientos

En el ensayo de mutación y recombinación somáticas en discos imaginales de alas de *D. melanogaster* se pueden realizar tratamientos crónicos o agudos, con larvas de diferentes edades, variando el tiempo de exposición al producto en función de ambas variables (figura 2.5.).

En este trabajo hemos realizado tratamientos crónicos con larvas de 3 días. Por lo tanto, el tiempo de exposición de las células imaginales al compuesto es de 48 horas. La elección de este tipo de tratamiento está basada en que es el recomendado para el análisis de compuestos de actividad genotóxica desconocida, ya que los tratamientos agudos sólo son eficaces con compuestos altamente mutagénicos (Graf et al., 1989). El periodo de tratamiento comprende aproximadamente las 5 ó 6 últimas rondas de división en las células imaginales alares, lo que representa más del 95% de todas las divisiones mitóticas individuales en el desarrollo del ala (Frei y Würigler, 1988).

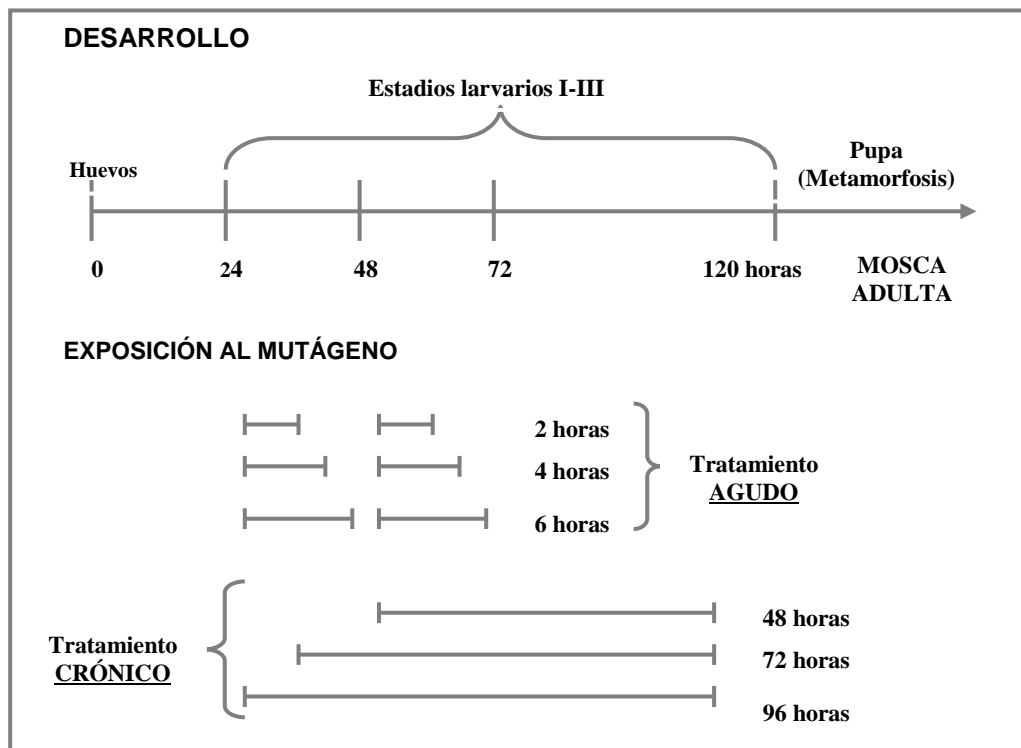


Figura 2.5. Tipos de tratamientos posibles, según el tiempo de exposición y la edad de las larvas tratadas. Modificado de Graf et al. (1984).

Todas las diluciones de las sustancias simples se preparan inmediatamente antes de ser utilizadas y se mezclan con el medio instantáneo justo antes de añadir las larvas, para evitar posibles modificaciones químicas del producto, que podrían alterar los resultados.

Se tratan unas 100 larvas por tubo y éstos se incuban a 25°C hasta que emergen las moscas adultas. Éstas se almacenan entonces en etanol al 70%, hasta que se procede a la preparación de las alas.

Para llevar a cabo tratamientos con infusiones de Plantas Medicinales, primero preparamos la infusión, utilizando el siguiente protocolo, y la dejamos enfriar, hasta los 20 °C, antes de preparar las diluciones:

- Hervir 100 ml de agua.
- Pesar 5.52 g de la planta, en el caso de las plantas vendidas al peso. En el caso de la Tila y la Manzanilla ponemos 4 bolsitas en las que vienen presentadas, cuyo peso aproximado por bolsa es:



- Tila1.55 g/bolsa.....5.86 g/4 bolsas.
- Manzanilla.....1.80 g/bolsa.....6.47 g/4 bolsas.
- Poner la planta en el agua y hervir durante 5 minutos. Excepto en el caso de la Valeriana, que por ser raíz hervimos durante 7 minutos.
- Tomar la temperatura de la infusión una vez retirada del fuego, (tabla 2.3.).
- Dejar 10 minutos reposar y colar la infusión.
- Dejar bajar la temperatura a 20 °C antes de preparar las diluciones.

Para el caso de *U. tomentosa*, que se presenta en comprimidos de 480 mg, el protocolo a seguir es el que se detalla a continuación:

- Hervir durante 10 minutos, 8 comprimidos (de 480 mg cada uno) en 2 litros de agua.
- Se deja enfriar y se guarda en frío, hasta el momento de preparar las diluciones.

Los resultados se expresan en concentración p:v (mg/ml), sin embargo, a la hora de trabajar en el laboratorio, por comodidad, lo haremos en tantos por ciento siguiendo la tabla que exponemos a continuación. Esto nos facilitará la operatividad en el laboratorio.

Así se procede en cada caso, para preparar las diluciones (tabla 2.4.)

Tabla 2.4. Tabla de concentraciones, en porcentajes, para preparar las diluciones.

Planta Medicinal %	H ₂ O (ml)	Medio Instantáneo (g)	Infusion (ml)
0	4	0.850	0
12.5	3.5	0.850	0.5
25	3	0.850	1
50	2	0.850	2
100	0	0.850	4

El rango de concentraciones de las infusiones se determinó previamente mediante ensayos de toxicidad en tratamiento crónico de las larvas.

Para los ensayos de antigenotoxicidad de las distintas infusiones se le añade la cantidad correspondiente de H₂O₂, en este caso 50 µl/4ml (0.12M). La dosis DL50 para el Peróxido de Hidrógeno se estima en una serie de tratamientos de barrido, utilizando dosis de potencias de diez. Hicimos un primer barrido grueso en una batería de diluciones desde 0-1000 µl de H₂O₂, y a continuación un barrido fino desde 0-400 µl de H₂O₂; usando para ello:



- *Tratamientos agudos con larvas de 3 días ± 4 horas.* En estos tratamientos agudos, de 4 horas, preparamos Peróxido de Hidrógeno en las siguientes concentraciones: 0, 50, 500 y 1000 $\mu\text{L}/2\text{ml}$.
- *Tratamientos crónicos.* Primero hicimos un barrido grueso para las mismas concentraciones de Peróxido de Hidrógeno que para el tratamiento agudo.

Este rastreo nos confirmó la dosis letal 50 (DL50). Realizamos un segundo tratamiento crónico de barrido más fino (0, 25, 50, 100, 200, 300 y 400 $\mu\text{l}/4\text{ ml}$ de H_2O_2). De estos tratamientos concluimos, observando la supervivencia de la población, que la dosis de Peróxido de Hidrógeno adecuada era de 50 $\mu\text{l}/4\text{ml}$ (0.12 M).

En el caso de tratamientos combinados, la preparación los medios de prueba se obtiene mezclando en el mismo tubo la solución de sustancia a ensayar con 50 $\mu\text{l}/4\text{ ml}$ (0.12 M) y el medio instantáneo. Es imprescindible dejar enfriar la infusión (20 °C) antes de añadir el Peróxido de Hidrógeno. La concentración de la infusión usada depende en cada caso de los resultados obtenidos en los tratamientos de genotoxicidad previos.

Para los ensayos S.M.A.R.T. con los fenoles, las concentraciones usadas fueron las elegidas después de los ensayos de toxicidad de los citados fenoles, que aparecen en el apartado de resultados. Estas concentraciones fueron las utilizadas para los estudios de anti y genotoxicidad de los fenoles que sometimos a estudio, así como para los pretratamientos con el mutágeno y para los pretratamientos con el fenol a ensayar. Las soluciones madre, a partir de las cuales se prepararon las distintas concentraciones ensayadas, se prepararon diluyendo cada fenol en etanol al 3%, a excepción de DHBA que se diluyó en agua.

Para cada uno de los fenoles se analizaron los siguientes rangos de concentraciones: *Apigenina* 0.0625 y 0.5 mM; *Bisabolol* y DHBA 250 y 1000 mM; *Limoneno* 1.6×10^{-3} y 1.56 mM; *Mentol* 1 y 8 mM; *Pulegona* 0.38 y 3 mM; *Quercitina* 0.009×10^{-3} y 0.072×10^{-3} y *Ác. Valerénico* 0.028×10^{-3} y 0.22×10^{-3} mM.

Así pues para dilucidar el papel antioxidante frente al Peróxido de Hidrógeno de los fenoles se han llevado a cabo en principio cuatro tipos de tratamientos: (i) un tratamiento simple, (ii) un tratamiento combinado, (iii) un pretratamiento con el Peróxido de Hidrógeno y (iv) un pretratamiento con el fenol a ensayar (en ambos casos durante 1 hora). Ya que los fenoles destoxifican actuando como aceptores finales o terminators de otros radicales libres.

En el pretratamiento con el Peróxido de Hidrógeno, después de 1 hora, las larvas eran lavadas y sometidas a un tratamiento crónico para los distintos fenoles a las diferentes concentraciones; mientras que para el pretratamiento con el fenol a ensayar, después de 1



hora en el fenol, las larvas se lavaban y se exponían a un tratamiento crónico en el Peróxido de Hidrógeno (50µl/4ml, 0.12 M).

2.1.10. Preparación de las alas

Las moscas almacenadas en etanol al 70%, se analizan bajo la lupa para separar las de fenotipo salvaje (que corresponden al genotipo *mwh/flr³*) y clasificarlas por sexos.

Las moscas analizadas rutinariamente en el ensayo S.M.A.R.T. de alas son las transheterocigotas *mwh/flr³*. El resto de las moscas tratadas (*mwh/Bd⁶*) se identifican fácilmente por el carácter aserrado (*Beaded-Serrate*) de las alas y únicamente se analizan cuando se desea cuantificar la proporción de actividad genotóxica debida a recombinación somática (Zordan et al., 1991; Graf et al., 1992b). La proporción de manchas cuyo origen no es debido a recombinación se obtiene restando la frecuencia de manchas *mwh* en las larvas *mwh/Bd⁶* (originadas únicamente por mutaciones puntuales, ya que la inversión *TM3* impide la recombinación) a la obtenida en larvas *mwh/flr³* (originadas por mutación puntual o recombinación).

Antes de proceder a la preparación de las alas, las moscas almacenadas se lavan en agua destilada para retirar los restos de etanol. Después, se embeben en solución Faure y, con unas pinzas muy finas, se separan las alas, que se colocan alineadas sobre un portaobjetos. Cuando se completan los portaobjetos (con unas 40 alas cada uno), se dejan secar, al menos 24 horas, en una atmósfera libre de polvo (en el interior de una placa de Petri, por ejemplo). Entonces se deja caer una pequeña gota de solución Faure sobre las alas y se coloca encima un cubreobjetos sobre el que se depositan unas pesas de entre 250 y 500 g. La preparación se deja así unas 24 horas, para permitir que se seque por completo y quede perfectamente fijada. Se pueden entonces sellar los bordes con esmalte de uñas y la preparación quede lista para su examen (figura 2.6.).

La solución de Faure utilizada en este trabajo fue elaborada por nosotros y se compone de: Goma arábica (30 g), glicerol (20 ml), hidrato cloral (50 g), y agua (50 ml).

Esta solución puede utilizarse también diluida al 50% con agua destilada. Esto hace el montaje más fácil y el secado de las preparaciones más rápido. También se puede acelerar el secado colocando los portas en una estufa a unos 60°C, ó sobre una placa térmica a unos 40°C, durante unos 30 minutos.



Figura 2.6. Fotografía a la lupa de un porta (realizada por García y Romero, 2004).

2.1.11. Análisis microscópico de las alas

El ala de *D. melanogaster* se compone de dos capas de células, dorsal y ventral. En las moscas de fenotipo salvaje, cada una de estas células emite un único pelo o tricoma.

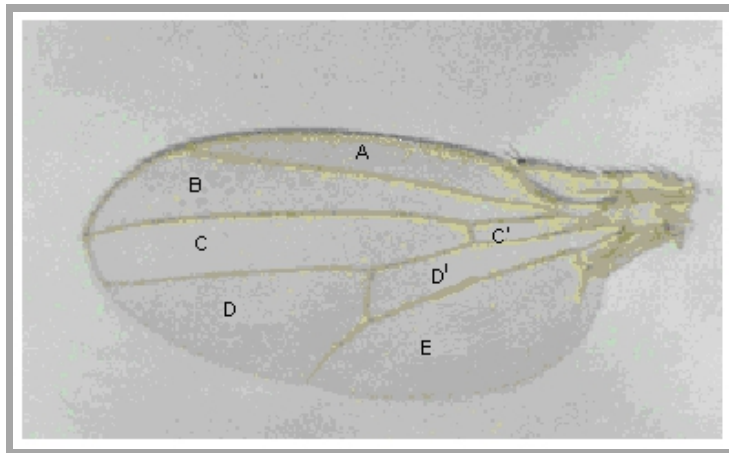


Figura 2.7. Fotografía a la lupa de un ala de *D. melanogaster*, mostrando los sectores analizados en el ensayo S.M.A.R.T. de alas (realizada por García y Romero, 2004).

El análisis de las alas se realiza bajo un microscopio a 400 aumentos y consiste en localizar clones o células individuales que manifiesten fenotipo mutante *mwh* ó *flr*, sobre el fondo de células de fenotipo salvaje. Para cada clon encontrado, se registra el tamaño y el sector del ala en el que se encuentra. Se consideran únicamente los sectores distales del ala: A, B, C', C, D', D, E (Graf et al., 1984) (figura 2.7.).



Los tipos de manchas o clones que se pueden encontrar son:

- manchas simples *mwh*, formadas por células con 3 o más pelos cada una. Se ha observado, en las moscas de la línea homocigota *mwh*, que algunas células emiten 2 pelos. Sin embargo, también es relativamente frecuente encontrar células con 2 pelos en alas heterocigotas *mwh+ / + flr³*, que parecen formadas independientemente de la mutación *mwh*. Como criterio, se considera un clon *mwh*, aquel formado por células con múltiples pelos, en el que al menos una de ellas tiene 3 pelos o más, aunque también contenga células con 2 únicos pelos.
Las alteraciones genéticas que pueden dar lugar al fenotipo *mwh* son: mutación puntual, deleción, recombinación mitótica entre los loci *mwh* y *flr*, o no disyunción (figura 2.8.).
- manchas simples *flr³* formadas por células de fenotipo *flare*. El fenotipo *flr* no suele expresarse completamente en clones pequeños (de menos de 3 células). Según Szabad y colaboradores (1983), el producto codificado por el alelo salvaje se diluye en las primeras 1 ó 2 divisiones después de la mutación, pero sería todavía suficiente para producir el fenotipo normal. Tampoco es frecuente encontrar clones *flr* muy grandes, debido posiblemente a su efecto letal. El fenotipo *flr* se pone de manifiesto principalmente por una mutación puntual o deleción en el alelo salvaje de este locus (figura 2.8.).
- manchas gemelas, formadas por células adyacentes de fenotipo *mwh* y *flr*, respectivamente. Se originan exclusivamente por recombinación mitótica entre el locus *flr* y el centrómero (figura 2.8.).

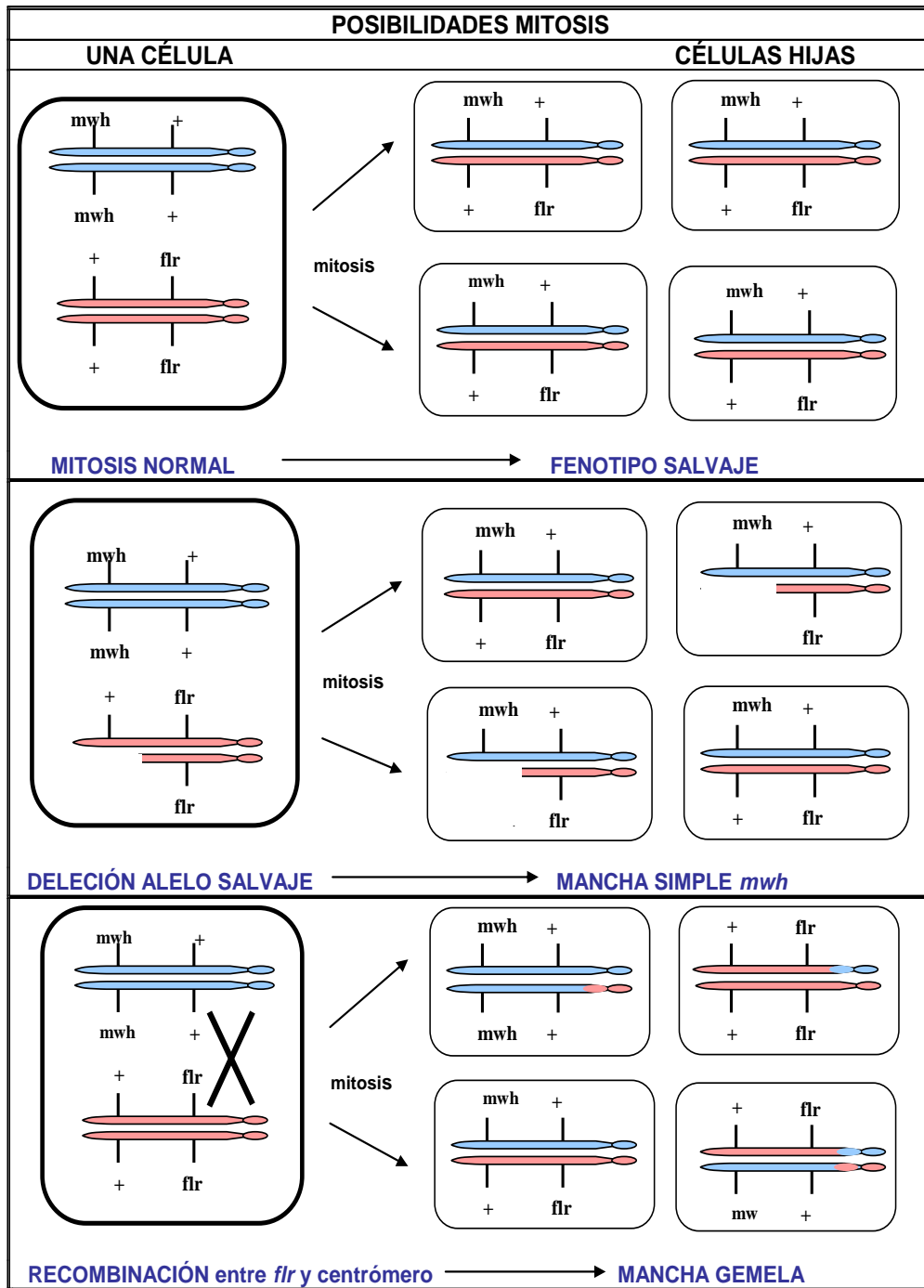


Figura 2.8. Esquema ilustrativo de la formación de manchas simples *mwh*, *flr*³ y gemelas.

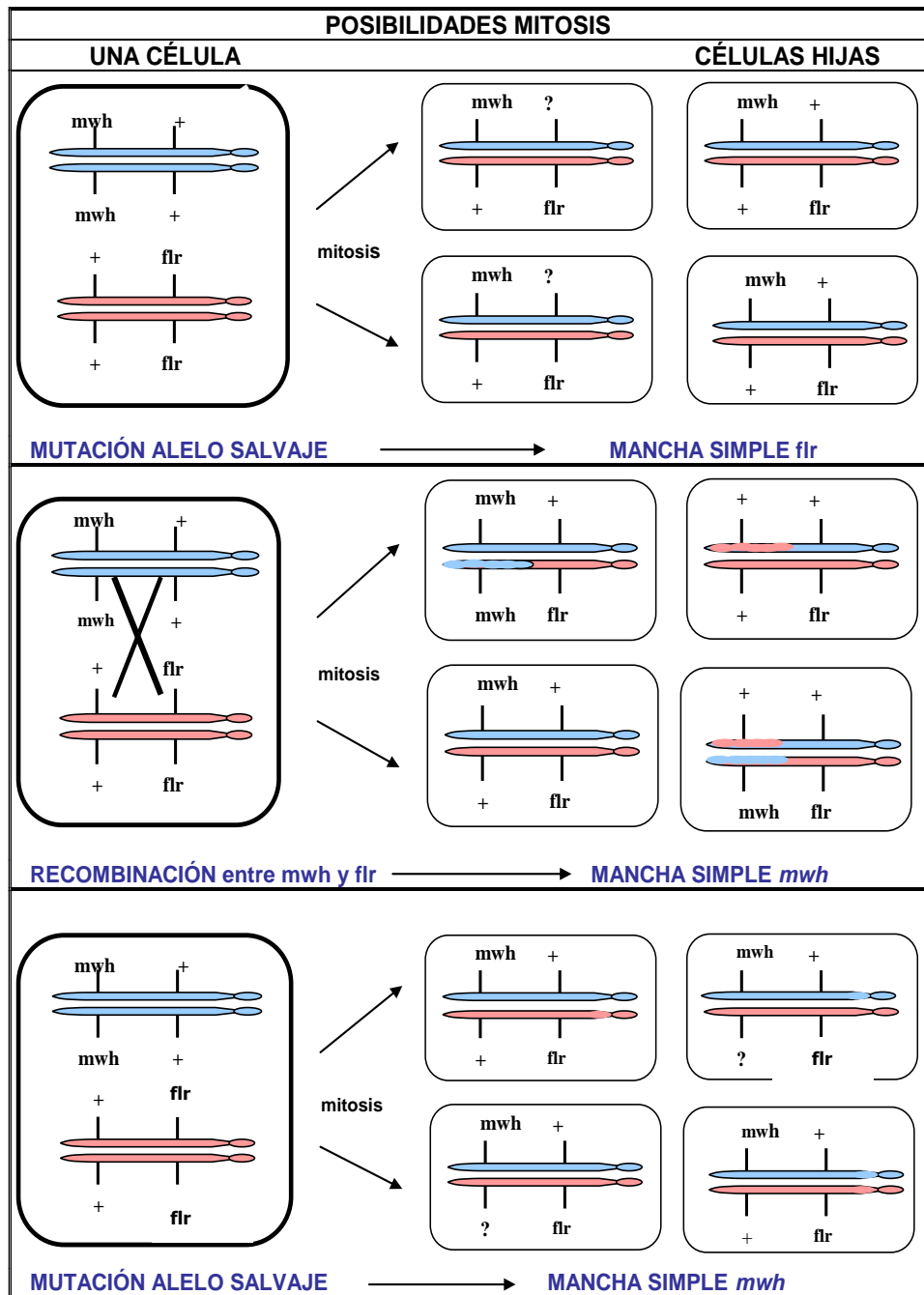


Figura 2.8. (cont.) Esquema ilustrativo de la formación de manchas simples *mwh*, *flr*² y gemelas.



En la figura 2.9. vemos fotografías en las que aparecen ejemplos de los diferentes tipos de manchas que podemos encontrar.

Las manchas grandes presentan una forma alargada, longitudinal al eje del ala, indicando la dirección principal de crecimiento (García-Bellido y Merriam, 1971), y son generalmente continuas. A veces, entre las células mutantes aparecen grupos de células salvajes, debido posiblemente a una separación de las células de un clon en desarrollo por presiones interiores del tejido o movimientos de células independientes. Como criterio, se consideran 2 manchas independientes aquellas separados por 3 o más filas de células salvajes.

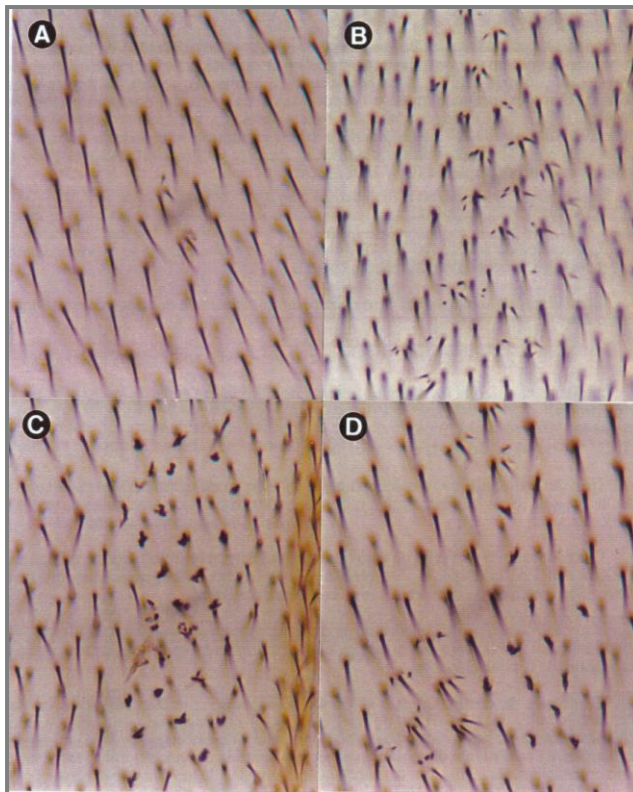


Figura 2.9. Fotografías de los diferentes tipos de manchas que se pueden encontrar en el ensayo S.M.A.R.T. de alas. A) mancha simple pequeña mwh; B) mancha simple grande mwh; C) mancha simple flr; D) mancha gemela.

Las manchas gemelas y las simples muy grandes son muy poco frecuentes en las alas de moscas no tratadas.



Ya que la última o penúltima ronda de división ocurre dentro de la pupa (Postlethwait, 1978), cuando ha cesado la ingestión de alimento, es útil distinguir entre los clones inducidos en la pupa (los más pequeños) y los inducidos en etapas más tempranas del desarrollo (los más grandes). Así, la distinción de las manchas simples entre las de 3 o más células, y las pequeñas (1 ó 2 células), separa las poblaciones celulares diana expuestas durante o después de la ingestión del compuesto (Frei y Würigler, 1988). Esta delimitación no es exacta, debido a posibles variaciones en el desarrollo, diferencias en las propiedades de los compuestos (ingestión, transporte, bioactivación, estabilidad, persistencia, etc.), o, incluso, porque ciertos clones pueden tender a permanecer pequeños (Graf et al., 1984).

2.1.12. Inhibición de la genotoxicidad

Indica el porcentaje de reducción de una sustancia ensayada frente a un potente mutágeno. Para ello se calcula la diferencia de mutaciones entre el mutágeno sólo y el combinado (Sustancia + Mutágeno) referido al mutágeno y se expresa en porcentaje.

$$\frac{(\text{Genotoxina} - \text{combinado}) \times 100}{\text{Genotoxina}}$$

2.1.13. Tratamiento estadístico

Los resultados del ensayo S.M.A.R.T. en alas de *D. melanogaster* se expresan como frecuencia relativa del número de manchas por ala.

El análisis de los datos obtenidos debe permitir contestar a dos tipos de cuestiones fundamentales:

- 1º. ¿Existen diferencias entre las frecuencias observadas en sucesivas repeticiones?
- 2º. ¿Existen diferencias entre las frecuencias observadas entre las series tratadas y los controles?

2.1.13.1. Comparación entre repeticiones

Uno de los requisitos que debe cumplir un ensayo de genotoxicidad es que los resultados sean reproducibles, es decir, que no varíen significativamente en sucesivas repeticiones.



Cuando tenemos una serie de datos, correspondientes a los resultados de diferentes repeticiones del mismo experimento, interesa calcular los estadísticos muestrales, que dan información acerca de las características de la muestra analizada.

En nuestro caso, los resultados obtenidos en los controles negativos a lo largo del tiempo suponen repeticiones sucesivas del mismo experimento, cada una de las cuales es una muestra de la población total.

Para valorar si las variaciones observadas entre diferentes repeticiones en un mismo grupo de datos son estadísticamente significativas, se ha utilizado el procedimiento CATMOD del SAS® (Statistic Analysis System) (1995) que analiza las tablas de contingencia de 2 x k mediante un modelo lineal.

2.1.13.2. Comparación entre series tratadas y controles

Para llegar a determinar si el compuesto analizado puede ser considerado genotóxico, se requiere comparar los datos de las series tratadas con las de las series control (sin tratar). Se trata de determinar si la frecuencia de manchas que aparece en la serie tratada difiere significativamente de la encontrada en los controles, que corresponde a la frecuencia espontánea de mutación.

La formulación de dos hipótesis alternativas permite emitir un diagnóstico estadístico, de manera que el compuesto analizado puede clasificarse como positivo, negativo o inconcluyente.

- *Hipótesis nula (H_0):* "no hay diferencias en la frecuencia de mutación entre el control y el tratado".

- *Hipótesis alternativa (H_A):* "el tratamiento supone un incremento de la frecuencia de mutación de **m** veces comparado con la frecuencia esperada por mutación espontánea".

El factor de multiplicación **m** se fijó originalmente, de forma empírica (Graf et al., 1984; Frei y Würzler, 1988) en función de las frecuencias espontáneas normalmente observadas y siguiendo la práctica común en otros ensayos de genotoxicidad. Los valores de **m** utilizados son: 2 para manchas pequeñas y totales y 5 para manchas grandes y gemelas, ya que ambos tipos de manchas aparecen con una frecuencia espontánea muy baja.



Si se rechaza H_0 , implica que el tratamiento supone un incremento significativo de la frecuencia de mutación. Si, además, se rechaza H_A , significa que el tratamiento no produce el incremento requerido para considerar el compuesto como claro mutágeno. En este caso el compuesto se clasifica como mutágeno débil.

Si ninguna de las dos hipótesis se rechaza, los resultados se consideran inconcluyentes, ya que las dos hipótesis son mutuamente excluyentes y no pueden ser aceptadas a la vez.

En la tabla 2.5. se resumen los 4 posibles diagnósticos, con sus correspondientes probabilidades de error, siendo α y β los niveles de significación a los que se contrastan las hipótesis nula y alternativa, respectivamente. El nivel de significación utilizado es $\alpha=\beta=0.05$.

Tabla 2.5. Alternativas posibles para aceptación y rechazo de las hipótesis nula (H_0) y alternativa (H_A).

HIPÓTESIS		H_A	
		aceptada ($1-\beta$)	rechazada (β)
H_0	aceptada($1-\alpha$)	INCONCLUYENTE $P=(1-\alpha)(1-\beta)=1-\alpha-\beta+\alpha\beta$	NEGATIVO $P=(1-\alpha)\beta=\beta-\alpha\beta$
	rechazada(α)	POSITIVO $P=\alpha(1-\beta)=\alpha-\alpha\beta$	DEBIL $P=\alpha\beta$

Para comprobar las dos hipótesis podemos utilizar dos métodos (Frei y Würigler, 1988):

- El test binomial condicional
- La prueba χ^2 para proporciones.

Los dos métodos son en principio equivalentes y tienen la ventaja de que no necesitamos estimar la frecuencia de mutación espontánea verdadera para comprobar la hipótesis alternativa.



Sean:

N_c = nº total de alas en el control

N_t = nº total de alas en el tratado

n_c = nº de manchas en el control

n_t = nº de manchas en el tratado

n = $n_c + n_t$ = nº total de manchas

p_0 = proporción de manchas esperadas en el control, según la H_0

$p_0 = N_c / (N_c + N_t)$

q_0 = proporción de manchas esperadas en el tratado, según la H_0

$q_0 = N_t / (N_c + N_t)$

p_A = proporción de manchas esperadas en el control, según la H_A

$p_A = N_c / (N_c + mN_t)$

q_A = Proporción de manchas esperadas en el tratado, según la H_A

$q_A = mN_t / (N_c + mN_t)$

$p_0 n$ = nº de manchas esperadas en el control, según la H_0

$q_0 n$ = nº de manchas esperadas en el tratado, según la H_0

$p_A n$ = nº de manchas esperadas en el control, según la H_A

$q_A n$ = nº de manchas esperadas en el tratado, según la H_A

m = factor de multiplicación

Test binomial condicional

Dados los parámetros definidos anteriormente, se calcula la distribución binomial para determinar las probabilidades con las que aparecen todos los diferentes resultados posibles esperados en un experimento con n mutaciones totales.

Así, se rechaza H_0 si,

$$P_0 = \sum_{i=0}^{n_c} \binom{n}{i} p_0^i q_0^{n-i} = \sum_{r=n_t}^n \binom{n}{r} q_0^r p_0^{n-r} \leq \alpha$$

y se rechaza H_A si,

$$P_A = \sum_{i=0}^{n_t} \binom{n}{i} p_A^i q_A^{n-i} = \sum_{r=n_c}^n \binom{n}{r} q_A^r p_A^{n-r} \leq \beta$$



En lugar de calcular las proporciones P_0 y P_A , se pueden utilizar las tablas de Kastenbaum y Bowman (1970) para contrastar las dos hipótesis en el test binomial condicional.

La hipótesis nula H_0 se rechaza si el n° de mutaciones en el grupo tratado (n_t) es mayor o igual que el de la tabla. La hipótesis alternativa H_A se rechaza si el número de mutaciones en el control (n_c) es mayor o igual al de la tabla.

Test χ^2 para proporciones

Cuando el tamaño muestral es suficientemente alto, la distribución binomial de probabilidades se aproxima a una distribución normal. Por lo tanto, el test χ^2 es equivalente al test binomial si n (n° de manchas totales) no es muy bajo (tomamos $n \geq 5$).

La fórmula general utilizada para el test χ^2 es la descrita anteriormente, aplicando la corrección de Yates. Por lo tanto, siendo $\alpha = \beta = 0,05$ y $u = 1$ grados de libertad;

H_0 se rechaza si,

$$\frac{\left(n_c - p_0 n - \frac{1}{2}\right)^2}{p_0 n} + \frac{\left(n_t - q_0 n - \frac{1}{2}\right)^2}{q_0 n} \geq \chi^2_{(\alpha, \nu)}$$

y H_A se rechaza si,

$$\frac{\left(n_c - p_A n - \frac{1}{2}\right)^2}{p_A n} + \frac{\left(n_t - q_A n - \frac{1}{2}\right)^2}{q_A n} \geq \chi^2_{(\beta, \nu)}$$

El valor de $\chi^2(0,05, 1) = 2.706$ para un test de una cola.

Hay que tener en cuenta que usando el test χ^2 para valores de frecuencia de mutación muy inferiores o muy superiores al del control, podemos obtener errores en la interpretación de los resultados, generalmente por el rechazo de ambas hipótesis, con lo que se obtendría un resultado débil. Por ello, si la frecuencia del tratamiento es menos de la mitad de la del control, el resultado se puede considerar negativo, y si es mayor de **m** veces el valor del control, se puede considerar como positivo, sin que sea necesario realizar la prueba estadística.



El test de χ^2 ha sido utilizado en este trabajo para analizar los datos del cruzamiento estándar, mediante un programa de Excel diseñado para un ordenador personal (Campos, 1999).

2.1.13.3. Frecuencia de inducción de clones

Para cada concentración analizada de cada compuesto, se ha calculado la frecuencia de inducción de clones por célula y por división celular. Esto permite comparar la actividad genotóxica de diferentes sustancias.

La frecuencia de inducción de clones se ha calculado, teniendo en cuenta únicamente las manchas *mwh* (manchas simples *mwh* y manchas gemelas), aplicando la siguiente fórmula:

$$f = \frac{n}{NC}$$

Donde:

f = frecuencia de inducción de clones por célula y por división celular

n = nº de manchas

N = nº de alas analizadas

C = nº de células por ala

Para este cálculo se ha considerado que el número de células analizadas por ala es aproximadamente 24400 (Alonso y Graf, 1989).

2.2. Ensayos de Citotoxicidad

Para determinar la actividad antiproliferativa y de inhibición del crecimiento tumoral de las sustancias analizadas en este estudio, usamos un ensayo de inhibición del crecimiento tumoral en células sanguíneas de la leucemia humana HL-60. Los análisis de citotoxicidad se llevaron a cabo usando la prueba de exclusión de Azul Tripán en células humanas de leucemia HL-60. La actividad tumoricida de las diferentes plantas medicinales, tanto de la infusión como de la planta completa liofilizada, ha sido determinada mediante el seguimiento del crecimiento de los cultivos celulares durante 3 días sucesivos. Se obtuvieron las curvas dosis respuesta de supervivencia con datos a las 72 horas de tratamiento.



2.2.1. Mantenimiento de las células

La línea celular HL-60 utilizada en este trabajo, ha sido cedida por el Dr. José M. Villalba Montoro del Departamento de Biología Celular de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Córdoba.

2.2.1.1. Medio de Cultivo

El medio de cultivo utilizado es el *RPMI-1640* sin L-Glutamina (Cat. nº: BE12-167F, Cambrex Bio Science Verviers). Este es un medio incompleto (no tiene todos los componentes necesarios para el mantenimiento del cultivo) por lo que se debe complementar para que las células puedan proliferar con L-Glutamina (G7513, Sigma), Suero Fetal Bovino (Cat. nº S01805, Linus) y una mezcla comercial de antibióticos (Penicilina/Estreptomina/Anfotericina, A5955, Antimycotic solution 100x stabilised, Sigma).

Para la preparación del medio de cultivo completo se descongela el suero a 4°C y se calienta 30 min a 56°C para descomplementarlo. A parte, se descongela la glutamina y la mezcla de antibióticos (4°C). La preparación del medio se realiza en la cámara de flujo vertical totalmente estéril. Una vez preparado, al RPMI-1640 (500 ml) se le añade el suero (50 ml), la glutamina (5 ml) y la mezcla de antibióticos (5 ml), se mezcla todo bien y se alícuota para evitar posibles contaminaciones, almacenándola a 4°C hasta su uso.

2.2.1.2. Cultivo celular

Las células son mantenidas en botellas estériles de cultivo *in vitro* de 40 ml y 25 cm² de superficie con 10 ml de medio líquido RPMI-1640 a 37°C y una atmósfera del 5% de CO₂ en oscuridad. Para ello se cultivan en un incubador de CO₂.

Los cultivos en fase de crecimiento exponencial son refrescados cada 48 h, iniciando un nuevo cultivo con una concentración de 250.000 células/ml en 10 ml de medio fresco RPMI previamente calentado a 37°C. De esta forma, las células duplicarán aproximadamente cada 24 h su número hasta que a las 48 h alcancen el millón de células por mililitro. Llegados a este punto se les cambia el medio ya que cuando alcanzan un número cercano a 2.000.000 cél/ml el cultivo empieza a morir y no es viable.

Las células se conservan en criotubos, en nitrógeno líquido, hasta su utilización. Los cultivos en fase exponencial se centrifugan a 1000-2000 rpm, durante 5 minutos, eliminando el sobrenadante y resuspendiendo en 1 ml de suero fetal con 10% de DMSO. La congelación se



efectúa por pasos: en principio se mantienen a 4°C durante el proceso de concentración celular, posteriormente el vial se lleva a -80°C durante 72h, después de las cuales se deposita en el tanque de nitrógeno líquido. Antes de su uso, las células se descongelan pasando los viales del nitrógeno líquido a hielo picado durante unos minutos, y le añadimos medio RPMi (a 37°C), sin suero para lavar las células y diluir el DMSO. A continuación, se centrifuga durante 5 min a 1000-2000 rpm, descartando el sobrenadante y añadiendo al pellet 10 ml de medio completo RPMi. Pudiendo resuspender y sembrar en botellas a la densidad celular deseada después de pasadas 24 horas, después de las cuales se debe refrescar el medio.

2.2.2. Sustancias analizadas

En las tablas 2.6, 2.7. y 2.8 se detallan las concentraciones finales de plantas y fenoles utilizadas en el presente trabajo.

2.2.2.1. Plantas secas liofilizadas

Tabla 2.6. Plantas secas liofilizadas.						
Planta	CONCENTRACION (mg/ml)					
<i>M. chamomilla</i>	0.5	1	2	4	8	16
<i>U. tomentosa</i>	0.5	1	2	4	8	16
<i>M. piperita</i>	0.5	1	2	4	8	16
<i>M. pulegium</i>	0.125	0.25	0.5	1	2	4
<i>T. cordata</i>	0.075	0.15	0.3	0.6	1.2	2.4
<i>V. officinalis</i>	0.125	0.25	0.5	1	2	4

2.2.2.2. Infusiones liofilizadas

Tabla 2.7. Infusiones liofilizadas.						
Infusión	CONCENTRACION (mg/ml)					
<i>M. chamomilla</i>	0.09	0.18	0.36	0.72	1.44	2.88
<i>U. tomentosa</i>	0.375	0.75	1.5	3	6	12
<i>M. piperita</i>	0.078	0.156	0.312	0.625	1.25	2.5
<i>M. pulegium</i>	0.09	0.18	0.36	0.78	1.56	3.125
<i>T. cordata</i>	0.225	0.45	0.9	1.8	3.6	7.2
<i>V. officinalis</i>	0.0015	0.003	0.006	0.06	0.6	1.31



2.2.2.3. Fenoles componentes de las plantas

Fenol	CONCENTRACION (mM)					
Apigenina	0.006	0.012	0.023	0.046	0.093	
Bisabolol	0.525	1.05	2.1	4.2	8.4	
DHBA	0.4	0.81	1.63	3.25	6.5	
Limoneno	0.39	0.78	1.55	3.11	6.22	
Mentol	0.8	1.6	3.2	6.4	12.8	
Pulegona	0.78	1.55	2.23	3.1	4.65	6.2
Quercitina	0.015	0.03	0.06	0.12	0.24	
Ac. Valerénico	0.013	0.027	0.054	0.11	0.214	

2.2.3. Tratamientos

Dos días previos a la realización del experimento se prepara un cultivo con 250.000 cél/ml para asegurar a las 48 horas (día del tratamiento), un elevado número de células con la intención de tomar la menor cantidad posible de medio viejo que contenga el número de células que se desea sembrar.

Por otro lado se preparan las soluciones en RPMI del compuesto a ensayar a las distintas concentraciones establecidas.

El tratamiento se realiza en placas estériles de 12 pocillos no adherentes apropiadas para el cultivo de este tipo de células en suspensión. En cada pocillo se colocará una concentración distinta del compuesto y un pocillo más con un control negativo al que sólo se le añade el medio RPMI con las células.

El volumen final de cada pocillo será de 2 ml, iniciando estos cultivos de tratamiento con 100.000 cél/ml del cultivo crecido durante 48 h, y completando el resto de volumen con la solución del compuesto correspondiente o bien del medio RPMI del control negativo. Primero se deposita el volumen que corresponda de la solución al que se le añaden las células.

2.2.3.1. Preparación de las Plantas secas liofilizadas

La planta completa es homogeneizada en una batidora de 700 vatios, pulverizada manualmente con nitrógeno líquido, y pasada por un tamiz de tela; posteriormente se envían al Servicio Centralizado de Apoyo a la Investigación donde se liofilizaron.



Se prepara una solución madre de la planta en el medio RPMI (previamente calentado a 37°C). Una vez bien disuelto, se esteriliza por filtrado (Millipore "non-pyrogenic", "sterile-R" de 0.20 µm) pasándolo a un bote estéril nuevo. Esta solución será la de mayor concentración en el experimento. De ella se obtendrán nuevas soluciones disolviéndola 1:1 hasta la de menor concentración.

2.2.3.2. Preparación de las Infusiones liofilizadas

Las infusiones se elaboraron utilizando bolsas individuales, multiplicando por cuatro el rango de concentración normal para uso humano (1 bolsa /200ml de agua por taza). Todas las infusiones se prepararon hirviéndolas durante 5 minutos (excepto *U. tomentosa* que fueron 7 minutos, por indicación del fabricante).

En el caso de los ensayos de citotoxicidad preparamos las infusiones, concentrándolas 3 veces más que para los ensayos S.M.A.R.T.; posteriormente se enviaron al Servicio Centralizado de Apoyo a la Investigación donde se liofilizaron.

Una vez se prepara la solución madre, las demás se obtienen de la misma forma que para el producto liofilizado. A partir de esta solución se prepararon las distintas diluciones que se ensayaron en las células HL-60.

2.2.3.3. Preparación de las Soluciones de los Fenoles

De cada fenol se preparó su solución madre a partir de la cual se realizaron las distintas disoluciones que se ensayaron en células HL-60. Todas las soluciones madre se prepararon diluyendo el fenol en etanol al 1 %, a excepción de *DHBA* que fue diluido en medio RPMi.

2.2.4. Recuento celular

Para realizar una siembra de células a partir de un cultivo de mantenimiento, es necesario saber el número de células por mililitro, es decir, determinar la concentración celular que hay en la botella de mantenimiento y determinar el volumen alícuota que se tomará para la siembra. El medio de cultivo debe calentarse a 37 °C para realizar el cambio. El recuento celular es importante para seguir el crecimiento de una población celular y establecer en qué fase se encuentra.



Para el recuento se utiliza el método del Azul Tripán (T8154, Sigma) que permite diferenciar las células vivas de la muertas ya que las vivas aparecen de un color amarillo transparente brillante y las muertas se tiñen de azul oscuro (al estar muertas, su membrana plasmática no es capaz de expulsar el Tripán y lo acumulan en su citosol tiñéndose). Para ello se utiliza la cámara de Neubauer o Hemocitómetro la cual está diseñada a modo de portaobjetos pero con una placa más gruesa de cristal. Contiene dos cámaras iguales y cada una de ella consta de lo siguiente:

- Cuadro central de 1mm de lado y 0.1 ml de profundidad, dividido a su vez en 25 cuadrados, cada uno de ellos subdividido en 16 cuadrados, con un total de 400 cuadrados de 0.05 mm de lado.
- Cuatro cuadrados uno en cada esquina, también de 1 mm de lado cada uno, subdivididos en 16 cuadrados de 0.25 mm de lado.

El recuento se realiza de la siguiente manera, en primer lugar se toma una alícuota de 10 μ l de la botella problema, añadiéndole la misma cantidad de Azul Tripán, se coloca un cubreobjetos encima de la cámara y se deposita por capilaridad la alícuota entre la cámara y el cubreobjetos. Para el recuento se cuentan las células presentes en los 4 cuadrados de las esquinas de las dos cámaras siendo el volumen de cada cuadrado y el cubre de 0.1mm³, es decir, 10⁻⁴ ml. El número de células, expresado en n^o de céls/ml, se obtiene multiplicando n^o de células contado en un cuadrado x 10⁴.

2.2.5. Citotoxicidad

Para la obtención de las curvas de inhibición de crecimiento tumoral se utilizó la media de al menos tres experimentos independientes de las células vivas contabilizadas a las 72 h del tratamiento referidas a las células vivas contabilizadas en el control.

Tratamiento estadístico

Se ha determinado el error típico de los tres experimentos y se añade la curva de ajuste que proporciona el programa Excel. En los casos en que hay respuesta para la obtención de las curvas de ajuste se aplicó el programa Excel de Microsoft a los datos de medias relativas porcentuales y se calculó la concentración inhibitoria 50 (CI50) que es la que inhibe el crecimiento al 50%.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN





3. Resultados y Discusión

Presentaremos los resultados de este estudio, para una mejor discusión de ellos, en dos partes bien diferenciadas:

1. Estudio de la toxicidad, genotoxicidad y antigenotoxicidad utilizando el MODELO S.M.A.R.T. en alas de *D. melanogaster*, tanto en las infusiones de las plantas medicinales seleccionadas como de sus fenoles más característicos.
2. Estudio de la citotoxicidad de las infusiones de las plantas medicinales sometidas a estudio, así como de la planta completa, y de sus fenoles más característicos, usando la línea celular HL-60.

3.1. Modelo S.M.A.R.T.

3.1.1. Análisis de los controles y de los cruces seleccionados

Para el presente trabajo de genotoxicidad y antigenotoxicidad hemos usado el ensayo de mutación y recombinación somática en alas de *D. melanogaster*, utilizando cuatro tipos de cruzamientos:

Cruzamientos estándar:

♀ *mwh/mwh* X ♂ *flr³/TM3, Bd^f*

♀ *flr³/TM3, Bd^f* X ♂ *mwh/mwh*

Cruzamientos NORR:

♀ *NORR/NORR; mwh/mwh* X ♂ *NORR/NORR; flr³/TM3, Bd^f*

♀ *NORR/NORR; flr³/TM3, Bd^f* X ♂ *NORR/NORR; mwh/mwh*

No obstante, a la hora de expresar los resultados únicamente indicaremos si se trata de un cruzamiento estándar o NORR, ya que según Campos (2003) no existe efecto parental para la expresión de los genes *mwh-flr³*, aconsejándose el uso indistinto de un cruce o el recíproco, pudiéndose seleccionar cualquiera de los dos cruces recíprocos, atendiendo solamente a criterios de operatividad del laboratorio.

En cada experimento se han analizado varias concentraciones de la planta a ensayar y un control negativo (agua) que corresponde al disolvente usado. Del mismo modo se han



seleccionado dos controles positivos (etil carbamato y Peróxido de Hidrógeno) para la validación periódica del ensayo. En los tratamientos de antimutagenicidad sólo hemos usado el Peróxido de Hidrógeno ya que nuestro interés se centra en la destoxificación de lesiones producidas por agentes de tipo oxidativo.

Después de los preceptivos ensayos preliminares se determinó la DL50 de cada infusión, para saber qué rango de dosis deberíamos usar en los distintos experimentos.

En cuanto al control positivo Peróxido de Hidrógeno, se realizó una serie de ensayos para determinar su DL50. Se seleccionó una batería de concentraciones y se realizó una serie de tratamientos agudos y crónicos. En un primer momento se hizo un barrido grueso de 0 a 1000 μl de H_2O_2 , en tratamientos agudo y crónico; y posteriormente otro más fino de 0 a 400 μl de H_2O_2 , en tratamiento crónico. Concluyendo que la DL50 para el Peróxido de Hidrógeno para tratamientos crónicos sería 0.12 M.

Antes de exponer los resultados que se han obtenido para cada una de las plantas medicinales, tanto en su estudio genotoxicológico como antigenotoxicológico, presentaremos un análisis de los controles utilizados en cada uno de los cruzamientos, estándar y NORR. En primer lugar, mostraremos los controles negativos con el fin de comprobar la reproducibilidad de los resultados en cada cruzamiento; y a continuación se analizarán los resultados obtenidos para los controles positivos, que son los que aseguran la eficacia del ensayo, así como la integridad de las cepas utilizadas.

Una vez analizados los controles negativos y positivos de cada cruzamiento, estándar y NORR, analizaremos los resultados de toxicidad, genotoxicidad y antigenotoxicidad de los ensayos diseñados.

3.1.1.1. Análisis de los controles negativos

Se han realizado un total de 8 experimentos definitivos con el cruzamiento estándar y 5 con el cruzamiento NORR, de alta bioactividad. Los resultados se recogen en la tabla 3.1 en la que se presentan los controles negativos de cada experimento. En cada caso se indica el número de alas analizadas y la frecuencia observada de manchas pequeñas, grandes y gemelas, así como la frecuencia total de manchas.

El análisis de heterogeneidad para cada tipo de cruzamiento ha resultado no significativo. Es importante resaltar el grado tan alto de reproducibilidad de los ensayos



observado, tanto en el cruzamiento estándar como en el NORR, a lo largo del tiempo. Por tanto queda demostrada la reproducibilidad del ensayo S.M.A.R.T., tanto en los cruces estándar como en los NORR.

Tabla 3.1. Frecuencia de mutación para cada categoría (pequeños, grandes, gemelos y totales) obtenidos usando el cruce estándar y NORR, para los controles negativos de diferentes experimentos.

Fechas	Número de Alas	Clones por ala (número de clones) diagnosis (1)			
		Clones simples pequeños (1-2 células) m = 2	Clones simples grandes (más de 2 células) m = 5	Clones gemelos m = 5	Clones totales m = 2
21-1-2000	40	0.33 (13)	0.025 (1)	0	0.35 (14)
24-2-2000	40	0.33 (13)	0.15 (6)	0	0.48 (19)
20-3-2000	40	0.45 (18)	0.15 (6)	0	0.6 (24)
24-3-2000	38	0.52 (20)	0.08 (3)	0	0.6 (23)
20-10-2003	30	0.46 (14)	0	0	0.46 (14)
6-11-2003	40	0.4 (16)	0	0.05 (2)	0.45 (18)
10-11-2003	40	0.45 (18)	0.05 (2)	0	0.5 (20)
17-11-2003	40	0.43(17)	0.1 (4)	0	0.53 (21)
TOTAL	308	0.42 (129)	0.07 (22)	0.006 (2)	0.5 (153)
EXPERIMENTOS CRUCE NORR					
27-1-2000	40	0.53 (21)	0	0	0.53 (21)
25-2-2000	40	0.52 (22)	0.1 (4)	0.025 (1)	0.68 (27)
20-3-2000	40	0.3 (12)	0.18 (7)	0	0.48 (19)
23-3-2000	40	0.7 (28)	0	0,025 (1)	0.73 (29)
24-3-2000	40	0.6 (24)	0.05 (2)	0	0.65 (26)
TOTAL	200	0.54 (107)	0.065 (13)	0.01 (2)	0.61 (122)

Los valores medios para cada cruzamiento son 0.5 mutaciones/ala para los cruces estándar y de 0.61 para los NORR. Sólo se observan valores que se alejan algo de la media en los cruces estándar del día 20-3-2000 y el 24-3-2000 (ambos con una frecuencia de 0.6); mientras que en los cruces NORR existe un mínimo de 0.48 (el día 20-3-2000) y un máximo de 0.73 (el día 23-3-2000). Este primer bloque de ensayos, en vista a los resultados obtenidos, apoya el criterio primario para la validación del test S.M.A.R.T. de homogeneidad dentro del



laboratorio. Para los diagnósticos estadísticos de cada compuesto, sin embargo, se utilizó para cada ensayo su control concurrente (Frei y Würigler, 1995) para evitar la sobredispersión y el tener que trabajar con tablas de contingencia desequilibradas en frecuencias absolutas.

Los valores medios estándar, de 0.5, y medios NORR, de 0.61, son diferentes como ya han apuntado otros autores (Osaba, 1995; El Hamss et al., 2003; Ramírez-Victoria et al., 2001) encontrándose valores más altos de mutación espontánea y más variables entre las cepas NORR; esto podría limitar su aplicación en los casos en que no sea necesaria activación metabólica.

3.1.1.2. Análisis de los controles positivos

Con el fin de comprobar la integridad de las cepas utilizadas y asegurarnos de que ningún factor externo incontrolado afecta a la sensibilidad del ensayo, incluimos el análisis de controles positivos. Para ello, usamos compuestos como controles positivos, cuya capacidad genotóxica en el ensayo esté sobradamente demostrada, como son el etil carbamato (uretano), que es un promutágeno que necesita una activación metabólica, y el Peróxido de Hidrógeno.

3.1.1.2.1. Etil carbamato

El uretano es un mutágeno y carcinógeno muy conocido, que se sabe induce una gran variedad de eventos mutacionales y relacionados con el cáncer. Es un promutágeno que se activa metabólicamente por el sistema enzimático *P-450* (Schlatter y Katz, 1990). Después de una epoxidación, forma aductos con el ADN (Gupta y Dani, 1989).

Desde hace tiempo se sabe que induce letales recesivos ligados al sexo (Oster, 1955), y sobrecruzamiento (Ahmed y Walker, 1975) en *D. melanogaster*, así como que es capaz de originar cánceres en diversos órganos de mamíferos (Nettleship y Henshaw, 1943; Mirvish, 1968; Stoner, 1991).

A continuación se muestran los resultados obtenidos para este compuesto en la tabla 3.2. El uretano, es mutagénico a las concentraciones de 0.005, 0.01 y 0.02 M en el cruce estándar y en el de alta bioactivación, produciendo mutaciones simples pequeñas, grandes y gemelas, por lo que podemos deducir que induce tanto mutaciones puntuales como sobrecruzamiento somático.



En la tabla 3.2. se puede observar que en el cruce estándar el etil carbamato aumenta significativamente la tasa de manchas totales ($p < 0.001$) en comparación con el control. El efecto del etil carbamato es dosis-dependiente para el total de las mutaciones: la frecuencia en el total de manchas pasa de 0.23 en ausencia de etil carbamato a 0.73, 0.96 y 1.5 para las concentraciones de 0.005 M, 0.01 M, y 0.02 M, respectivamente.

Tabla 3.2. Frecuencia de mutación para cada categoría (pequeños, grandes, gemelos y totales) obtenidos usando el cruce estándar y NORR, para el control positivo Etil-carmabato, a diferentes molaridades.

Concentración (M)	Número de Alas	Clones por ala (número de clones) diagnosis (1)			
		Clones simples pequeños (1-2 células) m = 2	Clones simples grandes (más de 2 células) m = 5	Clones gemelos m = 5	Clones totales m = 2
0	160	0.18 (29)	0.031 (5)	0.0125 (2)	0.23 (36)
0.005	160	0.58 (93)+	0.094 (15)+	0.056 (9) +	0.73 (117)+
0.01	160	0.85 (136)+	0.075 (12) i	0.03 (5) i	0.96 (153)+
0.02	80	1.3 (104)+	0.175 (14) +	0.025 (2) i	1.5 (120)+
CRUCES NORR					
0	198	0.37 (73)	0.04 (8)	0.015 (3)	0.42 (84)
0.005	160	1.61 (257)+	0.46 (74)+	0.12 (19)+	2.20 (350) +
0.01	160	4.3 (687) +	1.38 (221)+	0.54 (86)+	6.20 (994) +
0.02	40	7.35 (294) +	4.40(176)+	1.45 (58)+	13.20 (528)+

(1) Diagnóstico estadístico de acuerdo con Frei y Würzler (1.988): + (positivo), - (negativo) e i (inconclusivo). **m**: factor de multiplicación. Niveles de significación $\alpha = \beta = 0.05$, test de una cola sin corrección de Bonferroni.

Los resultados de genotoxicidad obtenidos para el etil carbamato cuando se utiliza el cruce NORR de alta bioactivación muestran un aumento significativo de la tasa de mutación en las manchas simples y gemelas. A 0.02 M, el etil carbamato aumentó 30 veces las mutaciones del control. Las frecuencias obtenidas son muy superiores a las de los cruces estándar. También, el total de mutaciones ha aumentado a 3, 6.5 y 8.5 veces para 0.005, 0.01 y 0.02 M respectivamente, en relación con el cruce estándar.

Hemos detectado actividad mutagénica, expresada en un incremento de manchas simples pequeñas, grandes y gemelas para el uretano utilizando el cruce de alta bioactivación, así como actividad mutagénica para manchas simples pequeñas, grandes y totales cuando se



trabaja con el cruce estándar. Las diferencias encontradas entre los dos cruces, estándar y alta bioactivación, son semejantes a las halladas por otros autores que han utilizado cepas de alta bioactivación del ensayo S.M.A.R.T. Las experiencias de Frölich y Würzler (1990 a) cuando utilizan las cepas estándar y las primeras desarrolladas para el sistema S.M.A.R.T. de alta bioactivación (cruce ORR) para ensayar la mutagenicidad del uretano, arrojan resultados semejantes a los nuestros, aunque como ya se ha explicado en la Introducción de este trabajo estas cepas poseían dificultades metodológicas para asignar fenotipos, con la consiguiente variabilidad entre experimentos y experimentador. Graf y Van Schaik (1992) trabajando con cepas estándar y dos más de alta bioactivación (cepas ORR originarias y cepas ORR mejoradas) obtienen los mismos resultados diferenciales entre el cruce estándar y los de alta bioactivación. Osaba et al. (1999) y El Hamss et al. (2003) encuentran una frecuencia de mutaciones totales superior en el cruce NORR y valores inconclusivos para las manchas gemelas en el cruce estándar, mientras que en el NORR los valores para manchas gemelas son claramente positivos.

3.1.1.2.2. Peróxido de Hidrógeno

El Peróxido de Hidrógeno es un agente generador de especies electrofílicas que puede causar numerosos daños, entre ellos el genético (Allen y Tresini, 2000). Existe una vasta colección de datos que sugieren que el H_2O_2 actúa como mutágeno endógeno, siendo responsable de algunos de los riesgos más elevados de cáncer, que suelen estar asociados con inflamaciones persistentes (Fitzpatrick, 2001).

D. melanogaster produce catalasa, tanto en estadio larvario, como en el de adulto (Nickla et al. 1983). Sin embargo, cuando los individuos son sometidos a estrés por H_2O_2 , se observa la estimulación de la síntesis de actina y de proteínas del citoesqueleto, al igual que ocurre cuando los individuos son sometidos a estrés térmico (Courgeon et al., 1993). La implicación de elementos del citoesqueleto en diversas situaciones de estrés en ésta y otras especies (Rodríguez-Ortega, 2003), sugiere que es un mecanismo transversal muy generalizado en la respuesta a estímulos externos. El Peróxido de Hidrógeno actuaría activando elementos reguladores que se unen al promotor de proteínas de estrés térmico (Becker et al., 1991). Se han descrito 215 efectos del Peróxido de Hidrógeno que estimulan a más de 100 genes, la mayoría de ellos incrementando la transcripción (Allen y Tresini, 2000).



Además de la formación endógena, el Peróxido de Hidrógeno también puede ser generado por ciertos alimentos, comprobándose que es mutagénico en procariotas (Dorado et al., 1987; Alexandre-Durán et al., 1987; Alonso-Moraga et al., 1988).

Nuestro grupo ha estudiado por primera vez la genotoxicidad del Peróxido de Hidrógeno en el modelo S.M.A.R.T. de alas. Recientemente, se han llevado a cabo experiencias con otros agentes oxidantes utilizando el ensayo mutaciones y recombinaciones somáticas de ojos w/w^+ (Gaivao et al., 1999), encontrándose que los test de mutaciones y recombinaciones somáticas son una herramienta apropiada para evaluación de agentes que se comportan como inductores de especies reactivas de oxígeno. Estas EROs, las ERNs (especies reactivas de nitrógeno) y las especies reactivas de cloro son producidas en animales y en humanos bajo condiciones fisiológicas y patológicas (Evans y Hallivell, 2001).

Al ser nuestras experiencias con Peróxido de Hidrógeno en el test S.M.A.R.T. las primeras que se realizaron en *Drosophila*, realizamos una serie de ensayos preliminares de tanteo para determinar la DL50 del Peróxido de Hidrógeno en larvas de *D. melanogaster*. Seleccionamos para ello una batería de concentraciones y realizamos una serie de tratamientos agudos y crónicos, obteniendo los resultados que presentaremos en las tablas 3.3., 3.4., 3.5. y 3.6. En ambos tratamientos se hizo un barrido grueso de 0 a 1000 μ l de H_2O_2 , y posteriormente otro más fino de 0 a 400 μ l de H_2O_2 , para un segundo tratamiento agudo, según se recoge en las tablas siguientes.

➤ **Tratamiento agudo** (con larvas de 3 días \pm 4 horas). En un primer barrido grueso (durante 4 horas), usamos 20 larvas por cada concentración de Peróxido de Hidrógeno (tabla 3.3.), obteniendo los siguientes resultados cualitativos.

Tabla 3.3. Resultados cualitativos obtenidos del tratamiento agudo. (H_2O_2 al 33%)				
Hora	0 M	0.24 M	2.4 M	4.8 M
1^a	Viven (5) ⁽¹⁾	Viven, algunas mueren explotadas(7)	Mueren y huyen, flotan	Se enrollan sobre si y mueren.
2^a	Viven y ahogadas	Viven y huyen por la gasa	Huyen por la gasa y muertas	Muertas, no queda ninguna en el medio
3^a	ahogadas	Algunas vivas	Muertas	Mueren todas
4^a	flotan	Vivas	Muertas blancas	La mayoría necrosadas

⁽¹⁾ Población nacida del tratamiento agudo a las distintas concentraciones ensayadas. Las larvas recogidas se pasaron al medio para tratamiento hasta que eclosionaron.

**▪ Resultados de genotoxicidad de los Tratamientos Agudos**

Los resultados de la actividad genotóxica se muestran en la tabla 3.4. Nuestro estudio muestra que el Peróxido de Hidrógeno es genotóxico en el S.M.A.R.T., incrementando la frecuencia de las mutaciones totales. Se observa también que el factor tiempo de exposición de las larvas aumenta la frecuencia de las mutaciones y que la viabilidad de las larvas se ve afectada por el aumento de concentración y tiempo de exposición (Tabla 3.4). Vistos los efectos correlacionados de estos factores, hemos elegido un tratamiento con Peróxido de Hidrógeno a una concentración de 0.24 M durante 60 min como control positivo para nuestros experimentos con tratamientos agudos.

Concentración de Peróxido de Hidrógeno (M)	Tiempo de tratamiento (minutos)			
	30	60	90	120
0	0.36 (30) ⁽¹⁾	0.33 (40)	0.54 (24)	0.65 (24)
0.24	0.36 (40)	0.45 (40)	0.59 (32)	INS ⁽²⁾
0.48	0.4 (18)	1.22 (22)	INS ⁽²⁾	INS ⁽²⁾
0.60	0.11 (18)	0.3 (10)	INS ⁽²⁾	INS ⁽²⁾

⁽¹⁾ Número de alas analizadas
⁽²⁾ Número insuficiente de alas analizadas debido a la baja viabilidad en estas condiciones.

El efecto mutagénico del Peróxido de Hidrógeno es debido a que genera compuestos electrofílicos que producen daño genético (Allen y Tresini, 2000) y está bien establecido que el Peróxido de Hidrógeno es un mutágeno endógeno responsable de incrementar el riesgo de cáncer asociado a las inflamaciones crónicas (Fitzpatrick, 2001).

Los radicales de oxígeno derivados del Peróxido de Hidrógeno pueden actuar directamente en el genoma, causando daños cromosómicos que inducen mutaciones carcinogénicas (Burcham, 1999) o indirectamente mediante la modulación de la transcripción (Cerde y Weitzman, 1997; Du et al., 1994) o suprimiendo las vías normales de reparación del ADN (Ghosh y Mitchell, 1999; Hu et al., 1995). López et al. (2002) demostraron que el Peróxido de Hidrógeno produce inestabilidad en los microsatélites de células germinales de *D. melanogaster*. Nuestros resultados sobre la genotoxicidad del Peróxido de Hidrógeno usando el



modelo *in vivo* de *D. melanogaster* indican que este agente es capaz de inducir mutaciones somáticas.

La dosis letal está por debajo de 2.4 M en la cual observamos, que a las dos horas de tratamiento, las larvas huyen y están muertas. Confirmaremos esto con un tratamiento crónico para las mismas concentraciones de Peróxido de Hidrógeno usadas.

➤ **Tratamientos crónicos.** Para corroborar los resultados obtenidos en el tratamiento agudo anterior, realizamos un primer tratamiento crónico para la misma batería de concentraciones de Peróxido de Hidrógeno, obteniendo los siguientes resultados de este primer tratamiento crónico (tabla 3.5.).

Tabla 3.5. Resultados cuantitativos del tratamiento crónico. Barrido grueso.				
Peróxido de Hidrógeno (M)	0	0.12	1.2	2.4
Población nacidas (de 100 larvas)	26	20	0	0

Este ensayo nos confirma que la dosis letal está por debajo de los 2.4 M, por lo cual ahora realizaremos un tratamiento crónico de barrido más fino, desde 0 µl/4ml hasta 400 µl/4ml. Preparando las diluciones que se presentan en la tabla 3.6., al igual que los resultados de supervivencia que obtuvimos.

Tabla 3.6. Resultados cuantitativos del tratamiento crónico. Barrido fino.							
Peróxido de Hidrógeno (M)	0	0.06	0.12	0.24	0.48	0.72	0.96
Población nacidas (de 200 larvas)	176	196	121	110	103	108	91

Concluimos que la DL50 para el Peróxido de Hidrógeno en tratamientos crónicos será de 50 µl/4ml, es decir, una concentración 0.12 M.



▪ **Resultados de genotoxicidad de los Tratamientos Crónicos**

Tabla 3.7. Frecuencia de mutación para cada categoría (pequeños, grandes, gemelos y totales) obtenidos usando el cruce estándar, para el control positivo, Peróxido de Hidrógeno, a diferentes molaridades.

Concentración (M)	Número de Alas	Clones por ala (número de clones) diagnosis (1)			
		Clones simples pequeños (1-2 células) m = 2	Clones simples grandes (más de 2 células) m = 5	Clones gemelos m = 5	Clones totales m = 2
0	160	0.27 (42)	0.019 (3)	0.0125 (2)	0.29 (47)
0.12	80	0.6 (48) +	0.025 (2) i	0	0.63 (50)+
0.18	80	0.625 (50) +	0.05 (4) i	0.0125 (1) i	0.69 (55) +
0.24	40	0.775 (29) +	0.025 (1) i	0.025 (1) i	0.78 (31)+
0.48	26	0.81 (21) +	0	0	0.81 (21) +

(1) Diagnóstico estadístico de acuerdo con Frei y Würigler (1.988): + (positivo), - (negativo) e i (inconclusivo). **m**: factor de multiplicación. Niveles de significación $\alpha = \beta = 0.05$, test de una cola sin corrección de Bonferroni.

El rango seleccionado de concentraciones de Peróxido de Hidrógeno para estudiar su genotoxicidad han sido 0.12, 0.18, 0.24, 0.48 M. Como se observa en la tabla 3.7, esta molécula presenta un claro efecto mutagénico en los cruces estándar. A la vista de estos resultados podemos afirmar que el Peróxido de Hidrógeno es un mutágeno para *Drosophila* en las concentraciones de 0.12, 0.18, 0.24, 0.48 M. Para el total de manchas, la frecuencia de mutación pasa de 0.29 en ausencia de Peróxido de Hidrógeno a entre 0.63 y 0.81 para las concentraciones 0.12 M y 0.48 M respectivamente de Peróxido de Hidrógeno. Dicha distribución se resume en la figura 3.1.

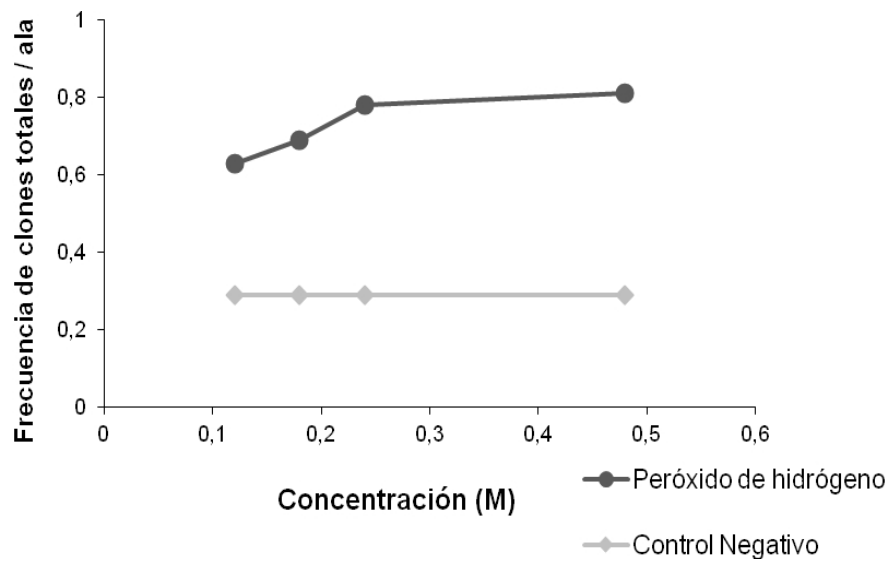


Figura 3.1. Distribución de las frecuencias de clones totales / ala obtenidos usando el cruce estándar, para el control positivo, Peróxido de Hidrógeno, a diferentes molaridades.

En el proceso de reducción molecular del oxígeno, el Peróxido de Hidrógeno se encuentra en el estadio anterior a la formación de radicales hidroxilo, por lo que sería un proveedor sin intermediarios de radicales hidroxilo a la lanzadera de electrofílicos sobre el ADN. Experimentalmente, hemos observado en el laboratorio una rápida respuesta de las larvas de *D. melanogaster* al tratamiento con Peróxido de Hidrógeno. Las larvas o bien mueren (se han ensayado dosis letales que rondan la DL50) o bien sobreviven desarrollando un color blanco más opaco del que normalmente exhiben, así como una textura más dura de sus tejidos, y proceden a formar la pupa muy rápidamente. La formación de especies reactivas por parte del Peróxido de Hidrógeno es muy rápida y puede desencadenar una larga serie de sucesos reguladores de muchos genes y proteínas, entre los que están la catalasa, factores de crecimiento, colágeno, ciclooxigenasa-2, factores de choque térmico y proteína quinasa (Allen y Tresini, 2000).



3.1.1.3. Selección de los cruces Estándar versus NORR para los ensayos de Genotoxicidad y Antigenotoxicidad

Se llevaron a cabo experimentos preliminares con una concentración de la infusión del 50%, (figura 3.2.) con sus respectivos controles negativos para cada planta, tanto para el cruce estándar como para el NORR.

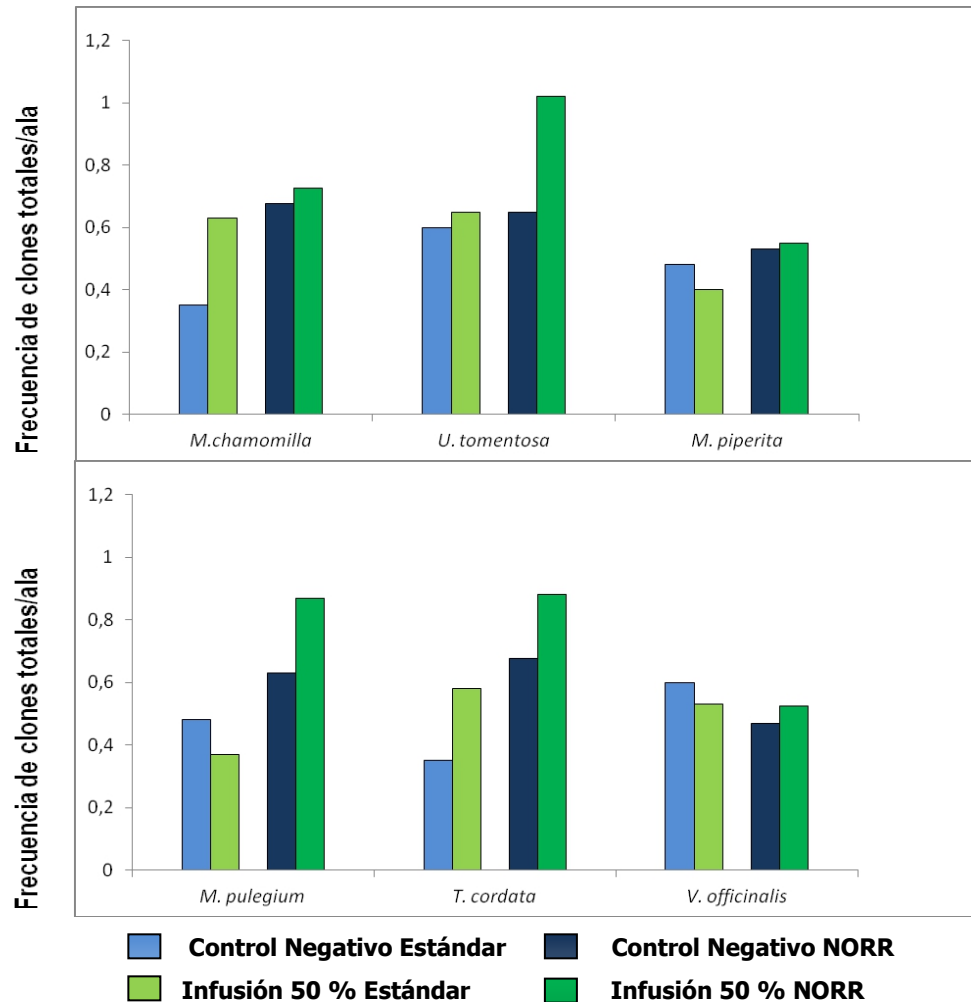


Figura 3.2. Selección del tipo de cruzamiento (estándar vs NORR) para la realización de los ensayos de genotoxicidad y antigenotoxicidad.

El incremento en la frecuencia de mutaciones totales inducido por *U. tomentosa* en los cruzamientos NORR no es significativo, y además no es debido a recombinación somática, sino a mutación puntual, ya que el incremento respecto al control no se da en clones de tipo gemelo (Graf y Van Schaik ,1992).



En los ensayos con las cepas estándar es donde se aprecia mejor el efecto del aumento de la frecuencia de formación de clones/ala respecto al aumento de la concentración (efecto de dosis); observando en las cepas NORR una respuesta cercana al cero al menos en *M. chamomilla*, *M. piperita* y *V. officinalis*. Por lo cual hemos seleccionado el cruzamiento estándar para realizar los tratamientos combinados frente al agente oxidante (Peróxido de Hidrógeno). El uso de la cepa NORR únicamente complicaría metodológicamente el estudio, ya que supondría detectar unas frecuencias de mutaciones basales más elevadas. Aunque existen muchos compuestos que son bioactivados por los mutantes NORR, estos suelen ser potentes carcinógenos (Graf y Van Schaik, 1992), en cuyo caso afortunadamente no nos encontramos, puesto que para este estudio se han usado plantas medicinales de mayoría de las cuales no hay datos de que sean carcinogénicas.

3.1.2. Estudio de las Infusiones de las plantas medicinales seleccionadas

En cada experimento se han analizado varias concentraciones de la planta a ensayar y un control negativo (agua) que corresponde al disolvente usado.

Después de los preceptivos ensayos preliminares para determinar la DL50 de cada infusión, las dosis utilizadas en los distintos experimentos han sido las que se muestran a continuación (tabla 3.8.).

Tabla 3.8. Dosis utilizadas en los distintos experimentos (mg/ml).				
Planta Medicinal	CONCENTRACIONES (mg/ml)			
	12.5 %⁽¹⁾	25%	50%	100%
<i>M. chamomilla</i>	<u>8.09</u>⁽²⁾	16.18	32.35	64.70
<i>U. tomentosa</i>	-	<u>0.48</u>	0.96	1.92
<i>M. piperita</i>	-	<u>13.8</u>	27.60	55.20
<i>M. pulegium</i>	-	<u>13.8</u>	27.60	55.20
<i>T. cordata</i>	<u>7.33</u>	14.65	29.30	58.60
<i>V. officinalis</i>	-	<u>13.8</u>	27.60	55.20

(1) Denominación utilizada en las gráficas y tablas siguientes.

(2) Dosis usadas para el estudio de la antigenotoxicidad de las plantas medicinales frente al agente oxidante aparecen en negrita y subrayada.



Para su estudio clasificamos las plantas en tres categorías:

- Plantas medicinales con actividad antiinflamatoria.
- Plantas medicinales con actividad digestiva.
- Plantas medicinales con actividad sedante.

3.1.2.1. Plantas con actividad antiinflamatoria:

M. chamomilla-U. tomentosa

3.1.2.1.1. Resultados de Toxicidad

Es la primera vez que se estudia la toxicidad de infusiones de estas plantas en *D. melanogaster*, por lo que las escasas comparaciones que podamos hacer han de salvar la diferencia en la escala evolutiva entre mamíferos (*in vitro e in vivo*) e insectos (*in vivo*) y la presentación del compuesto probado por otros autores, ya que a veces suele utilizarse el aceite esencial y nosotros hemos usado infusión de las plantas.

Se ha ensayado la supervivencia a las concentraciones de 25, 50 y 100% para estas dos plantas. Los resultados se muestran en la figura 3.3.

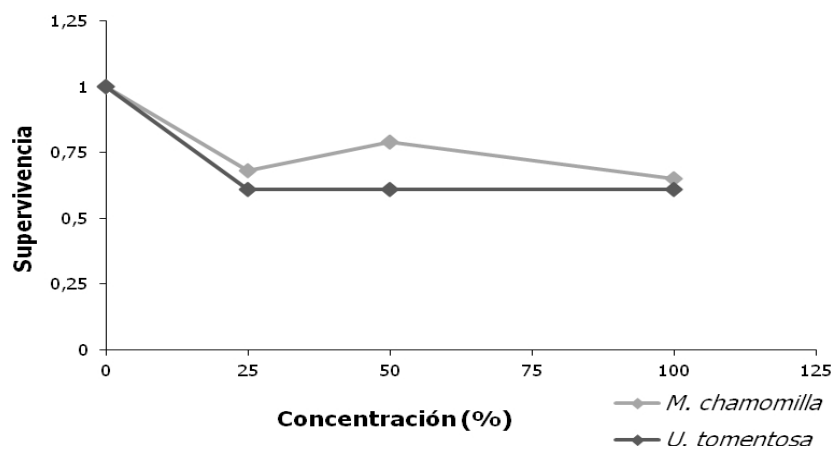


Fig. 3.3. Toxicidad de las plantas consideradas antiinflamatorias (expresado en tanto por 1, respecto del control negativo).

Para *M. chamomilla* podemos observar un ligero aumento y estabilización, mientras que *U. tomentosa* tiene un efecto constante independientemente de la concentración. Al no



observar efecto de dosis en nuestros ensayos, hemos calculado los valores medios de toxicidad para cada planta (1 – supervivencia media), encontrando unos valores moderados de 0.3 y 0,39 para las infusiones de *M. chamomilla* y *U. tomentosa* respectivamente.

Existen escasos datos sobre toxicidad de las plantas seleccionadas por nosotros. No se tiene ninguna referencia de estudios sobre la toxicidad de la infusión en el caso de *M. chamomilla*. Solamente se conocen estudios con el aceite esencial de *M. chamomilla*, cuyos efectos se estudiaron contra el estado larvario L3 de *Anisakis* tipo I; sugiriendo los resultados que la actividad larvicida puede resultar de la acción sinérgica de diferentes compuestos del aceite esencial de *M. chamomilla*; además, el aceite esencial no tiene efectos irritantes sobre el intestino (Romero et al., 2012).

Estudios anteriores al nuestro muestran ausencia de toxicidad *in vitro* en células de ovario de hámster chino y en células bacterianas de *U. tomentosa* (Santa Maria et al, 1997). Keplinger et al., (1999) encontraron los extractos acuosos de *U. tomentosa* ligeramente tóxicos en ratas y humanos cuando se administran crónicamente. Aunque sí se han observado efectos tóxicos en términos de hemólisis o aumento de contenido de la metahemoglobina en tratamientos con extractos de *U. tomentosa*, en eritrocitos humanos (Bors et al., 2009). Trabajos recientes (Bors et al., 2011) confirman el efecto antioxidante de los extractos de *U. tomentosa*. Un último estudio demuestra cambios en la forma y el tamaño de los eritrocitos humanos incubados en extractos de *U. tomentosa* (Bors et al., 2012).

En resumen, los datos que se tienen de las plantas utilizadas respecto a toxicidad o no existen (como es el caso de *M. chamomilla*) o si son ligeramente tóxicos como el caso de *U. tomentosa*, coincidiendo en este caso con los nuestros.

3.1.2.1.2. Resultados de Genotoxicidad-Antigenotoxicidad de *M. chamomilla* y *U. tomentosa* frente al Peróxido de Hidrógeno

Las civilizaciones antiguas ya conocían el valor terapéutico de las plantas medicinales. El documento sobre plantas medicinales más antiguo conservado hasta nuestros días pertenece a la civilización egipcia: es el papiro de Ebers, que data del año 1.500 a.C. y en el que ya aparecen, por ejemplo, el ajo y el hinojo. Estos conocimientos fueron difundidos y ampliados por griegos y romanos; más tarde, fueron traducidos, profundizados e incluidos en recetarios por estudiosos árabes, monjes y alquimistas; y, como siempre, la transmisión oral popular también jugó un papel muy importante en su conocimiento y divulgación. La difusión de estos saberes se vio notablemente enriquecida por las aportaciones realizadas gracias a la



ampliación de las rutas comerciales, que se dirigieron tanto hacia la India y China, como hacia el Nuevo Mundo, y que favorecieron un muy importante intercambio de especias y de hierbas hasta entonces desconocidas en Occidente, como el jengibre o la canela.

En el presente apartado hemos contrastado la hipótesis de seguridad o ausencia de genotoxicidad de las plantas medicinales antiinflamatorias seleccionadas en el sistema modelo eucariótico de *D. melanogaster*. Subsecuentemente, hemos llevado a cabo ensayos de antigenotoxicidad en el mismo sistema para detectar efectos promotores de salud debidos a actividad desmutagénica frente al Peróxido de Hidrógeno.

En la tabla 3.9. se muestran los resultados obtenidos en los ensayos de genotoxicidad y antigenotoxicidad de las plantas medicinales consideradas antiinflamatorias, y en la figura 3.4. podemos ver la distribución de las frecuencias de formación de los clones de ambos ensayos realizados para cada una de ellas.

No poseemos datos previos sobre genotoxicidad de infusiones de *M. chamomilla*, aunque basándonos en sus efectos antiinflamatorios y antioxidantes (Trouillas et al., 2003), eran de esperar valores no significativos de genotoxicidad en el test S.M.A.R.T. (frecuencia media de 0.6 clones/ala), a pesar de que existen datos positivos para inducción de intercambio de cromátidas hermanas por su aceite esencial (Hernández-Ceruelos, et al., 2002). Al igual que nosotros, no hemos encontrado referencias sobre extractos de *U. tomentosa* donde hayan sido descritos como mutagénicos, sino todo lo contrario, como se discutirá más adelante.



Tabla 3.9. Frecuencia de mutación para cada categoría (pequeños, grandes, gemelos y totales) en las plantas antiinflamatorias *M. chamomilla* y *U. tomentosa*.

Concentración Compuesto (mg/ml) (M)	Número de Alas	Clones por ala (número de clones) diagnóstico (1)			
		Clones simples pequeños (1-2 células) m = 2	Clones simples grandes (más de 2 células) m = 5	Clones gemelos m = 5	Clones totales m = 2
<i>M. chamomilla</i>					
0	40	0.325 (13)	0.025 (1)	0	0.35 (14)
16.18	24	0.5 (12) i	0.04 (1) i	0	0.54 (13) i
32.35	30	0.43 (13) i	0.2 (6) +	0	0.63 (19) i
64.70	40	0.525 (21) i	0.1 (4) i	0	0.625 (25) i
0.12 M H₂O₂					
0	40	0.45 (18)	0.05 (2)	0	0.5 (20)
0.12 M H ₂ O ₂	39	1.025 (40) +	0.026 (1) i	0.026 (1) i	1.08 (42) +
8.09	34	0.176 (6) -	0.059 (2) i	0.059 (2) i	0.294 (10) -
Combinado	34	0.264 (9) -	0.029 (1) i	0.029 (1) i	0.32 (11) -
<i>U. tomentosa</i>					
0	38	0.52 (20)	0.08 (3)	0	0.6 (23)
0.48	22	0.64 (14) i	0.09 (2) i	0	0.73 (16) i
0.96	40	0.55 (22) -	0.1 (4) i	0	0.65 (26) -
1.92	36	0.64 (23) i	0.25 (9) i	0	0.8 (32) i
0.12 M H₂O₂					
0	40	0.425 (17)	0.1 (4)	0	0.525 (21)
0.12 M H ₂ O ₂	40	0.975 (39) +	0.05 (2) -	0.025 (1) i	1.05 (42) +
0.48	40	0.775 (31) +	0.025 (1) -	0	0.8 (32) i
Combinado	38	0.553 (21) i	0.026 (1) -	0	0.58 (22) -

(1) Diagnóstico estadístico de acuerdo con Frei y Würzler (1.988): + (positivo), - (negativo) e i (inconclusivo). m: factor de multiplicación. Niveles de significación $\alpha = \beta = 0.05$, test de una cola sin corrección de Bonferroni.

NOTA: Los tratamientos combinados consisten en tratamientos conjuntos de la concentración de la infusión indicada y 0.12 M H₂O₂.

En la figura 3.4. observamos un efecto de dosis en *M. chamomilla*, aumentando la frecuencia de clones totales/ala conforme aumenta la concentración de dicha planta aunque no es estadísticamente significativo, mientras que para *U. tomentosa* observamos un ligero aumento en las concentraciones 25 y 100% (con 0.73 clones/ala de media para todas las concentraciones). En ninguno de los casos los valores son positivos, es decir, significativamente diferentes al control.

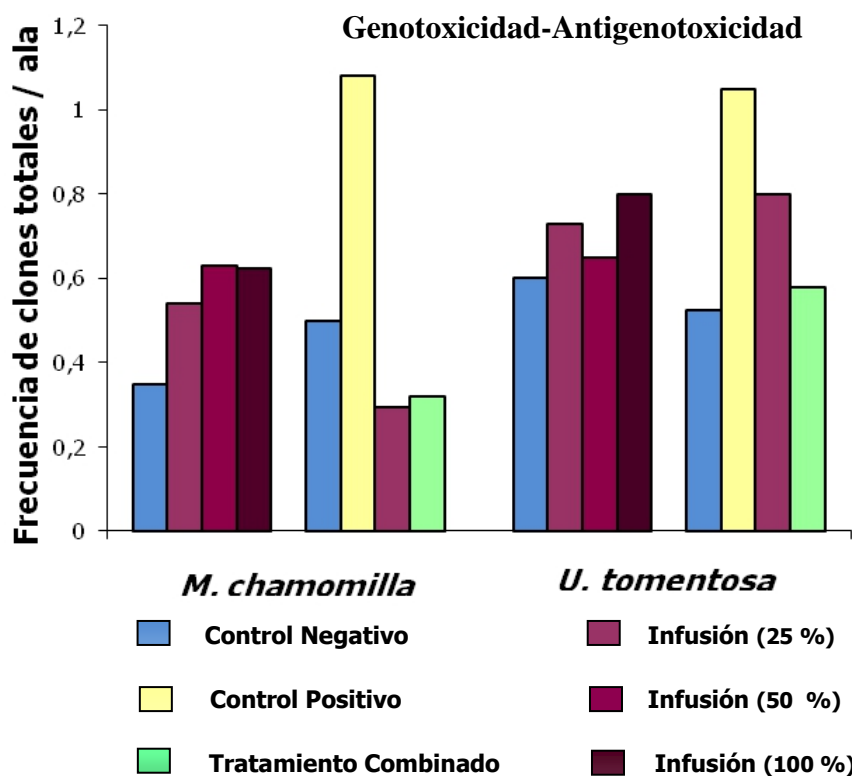


Figura 3.4. Resultados de Genotoxicidad y Antigenotoxicidad de las plantas del estudio consideradas antiinflamatorias.

Los resultados obtenidos por nosotros son los primeros en determinar la ausencia de genotoxicidad de *M. chamomilla* (Romero-Jiménez et al., 2005), así como su potencia antigenotóxica. Si quisiéramos analizar cuál de sus componentes es el causante de este efecto antimutagénico frente a especies reactivas de oxígeno como el Peróxido de Hidrógeno, deberíamos analizar independientemente algunos de los candidatos que dan otros autores como antioxidantes: (i) el sesquiterpeno *α-bisabolol* que es moderadamente antioxidante (Ruberto y Barata, 2000); (ii) el *chamazuleno* (Rekka et al., 1996); (iii) el alcaloide *apigenina*, que aunque es tumorigénica, es antiinflamatoria (Harborne y Williams, 2000) y no está descrita como antioxidante. Los resultados obtenidos en el presente trabajo son congruentes con la actividad antioxidante de *M. chamomilla* ya que ha conseguido desmutagenizar una importante proporción de efectos genotóxicos producidos por el agente oxidante Peróxido de Hidrógeno (superior al 70%).



U. tomentosa ha destoxificado el 90% de las mutaciones achacables al Peróxido de Hidrógeno, luego ha sido un eficaz agente antigenotóxico como antioxidante. Estos resultados están de acuerdo con los efectos antimutagénicos que protegen de las lesiones producidas por los rayos ultravioleta-A en el test de Ames con activación metabólica (Rizzi et al, 1993 y Keplinger 1998); con los de Sheng et al., (2000, a) en los que se descubre que los extractos de *U. tomentosa* potencian la reparación de roturas de ADN de cadena doble y simple; y con los de Carretero (2001) en los que se demostró que los extractos de *U. tomentosa* inhiben la actividad mutagénica de procarcinógenos y otros mutágenos causada por el humo del cigarro. Parece que la planta es capaz de neutralizar el efecto de sustancias orgánicas con actividad oxidante, así como su capacidad para inhibir la expresión de determinados genes inducibles durante el proceso inflamatorio; y en general con los datos sobre el potencial antioxidante de esta planta (Aquino et al, 1989 y Aquino et al., 1991), citados en el apartado de Introducción de este trabajo. Los fenoles *Apigenina* y *Ácido Protocatecuico* podrían ser responsables en parte de la potencia antigenotóxica observada.

3.1.2.2. Plantas con actividad digestiva:

M. piperita-*M. pulegium*

3.1.2.2.1. Resultados de Toxicidad

Los resultados de supervivencia a las distintas concentraciones (25-50-100%) para estas dos plantas se muestran en la siguiente figura 3.5.

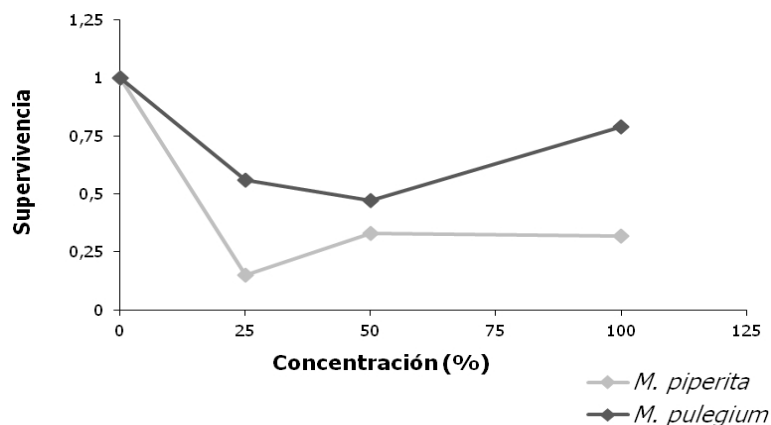


Fig. 3.5. Toxicidad de las plantas consideradas digestivas (expresado en tanto por 1, respecto del control negativo).



Para *M. piperita* no se observa incremento significativo de la supervivencia en relación a la concentración; *M. pulegium* exhibe un incremento fuerte de la supervivencia a la concentración 100%, aunque ninguna de ellas alcanza los valores del control, con valores de toxicidad media de 0.74 y 0.40 respectivamente.

Los trabajos hallados para *M. piperita* se suelen referir al aceite esencial de la planta. Este aceite es mínimamente tóxico en dosis orales, aunque produce lesiones en el cerebelo de ratas (Thorup et al., 1983) y se sugiere que es el fenol *Pulegona* el causante de esta toxicidad, por lo que las dosis a utilizar en mamíferos no pueden ser muy altas (Nair, 2001); nosotros hemos detectado valores muy elevados de toxicidad para la infusión de menta. *M. pulegium* en infusión produce reacciones hepatotóxicas en humanos (Stickel et al., 2001); estos resultados concuerdan con los nuestros. Aunque Teixeira et al., (2012) se atreven a señalar que los extractos y aceites esenciales de esta planta de origen mediterráneo tienen un enorme potencial como alternativa a los aditivos químicos para la industria alimentaria.

3.1.2.2. Resultados de Genotoxicidad-Antigenotoxicidad de *M. piperita* y *M. pulegium* frente al Peróxido de Hidrógeno

En la tabla 3.10. se presentan los resultados de los ensayos de genotoxicidad y antigenotoxicidad para las dos mentas. Para *M. piperita* observamos que a las concentraciones de 25 % y 50% disminuye la frecuencia de manchas totales por debajo del control negativo; este mismo efecto lo observamos en *M. pulegium*, con valores medios de 0.45 y 0.49 clones/ala respectivamente. Ninguno de estos valores es estadísticamente superior al control.

Las infusiones de *M. piperita* son antivirales y antibacterianas, probablemente debido a sus flavonoides (Newton et al., 2002), sin embargo no se ha descrito la capacidad antioxidante ni antimutagénica de ellas. Nosotros hemos obtenido un valor para inhibición de antigenotoxicidad frente al agente oxidativo Peróxido de Hidrógeno de 66% para esta infusión (figura 3.6.). Contrariamente, del aceite esencial de la menta sabemos que induce intercambios de cromátidas hermanas, así como que es genotóxico en el test S.M.A.R.T. (Lazutka et al., 2001). La discrepancia respecto a no genotoxicidad, y aún más respecto a la antigenotoxicidad encontrada por nosotros para infusiones de *M. piperita* respecto a los datos aportados por otros autores usando este mismo ensayo con su aceite esencial, puede no ser tal. Los fenoles que contiene la infusión serían antigenotóxicos, mientras que la *Pulegona*,



abundante en el aceite esencial, es tóxica (Gordon et al., 1987); además del mentol que es mutagénico en el test del cometa (Kiffe et al., 2003).

Tabla 3.10. Frecuencia de mutación para cada categoría (pequeños, grandes, gemelos y totales).

Concentración Compuesto (mg/ml) (M)	Número de Alas	Clones por ala (número de clones) diagnóstico (1)			
		Clones simples pequeños (1-2 células) m = 2	Clones simples grandes (más de 2 células) m = 5	Clones gemelos m = 5	Clones totales m = 2
M. piperita					
0	40	0.325 (13)	0.15 (6)	0	0.48 (19)
13.80	28	0.28 (8) -	0.11 (3) -	0	0.39 (11) -
27.60	32	0.4 (13) i	0	0	0.4 (13) -
55.20	26	0.5 (13) i	0.077 (2) -	0	0.577 (15) i
0	40	0.4 (16)	0	0.05 (2) i	0.45 (18)
0.12 M H ₂ O ₂	40	0.825 (33) +	0.05 (2) i	0	0.875 (35) +
13.8	40	0.35 (14) -	0	0	0.35 (14) -
Combinado	40	0.25 (10) -	0.05 (2) i	0	0.3 (12) -
M. pulegium					
0	40	0.325 (13)	0.15 (6)	0	0.48 (19)
13.80	42	0.36 (15) i	0.05 (2) -	0	0.40 (17) -
27.60	30	0.33 (10) i	0.03 (1) -	0	0.37 (11) -
55.20	40	0.55 (22) i	0.175 (7) -	0	0.725 (29) i
0	40	0.4 (16)	0	0.05 (2) i	0.45 (18)
0.12 M H ₂ O ₂	40	0.825 (33) +	0.05 (2) i	0	0.875 (35) +
13.8	40	0.3 (12) -	0.075 (3) i	0	0.375 (15) -
Combinado	40	0.25 (10) -	0.025 (1) i	0	0.275 (1) -

(1) Diagnóstico estadístico de acuerdo con Frei y Würzler (1.988): + (positivo), - (negativo) e i (inconclusivo). m: factor de multiplicación. Niveles de significación $\alpha = \beta = 0.05$, test de una cola sin corrección de Bonferroni.

NOTA: Los tratamientos combinados consisten en: La concentración de la infusión + 0.12 M H₂O₂.

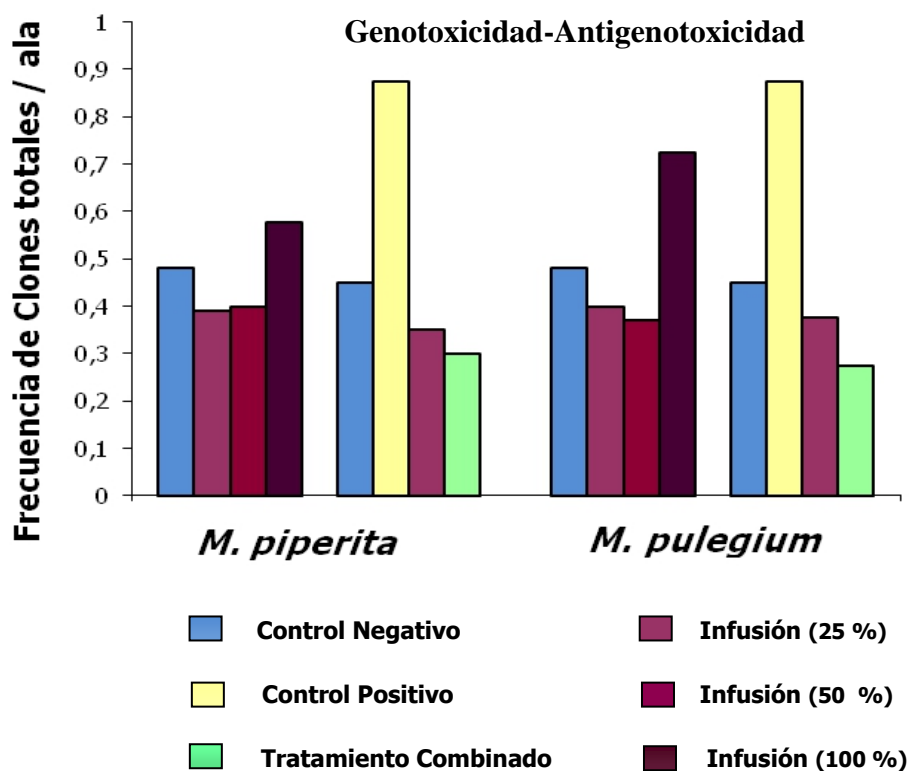


Figura 3.6. Resultados de Genotoxicidad y Antigenotoxicidad de las plantas del estudio consideradas digestivas.

No hemos hallado referencias sobre genotoxicidad para infusiones de *M. piperita*, ni de *M. pulegium*, aunque se tiene el indicador de que *M. piperita* no es teratogénica cuando se usan extractos hidroalcohólicos a ratones durante el periodo embrionario (Golalipour et al., 2011). Por el contrario, el aceite esencial de *M. pulegium* no ha resultado genotóxico en el test S.M.A.R.T. (Franzios et al., 1997 y Karpouhtsis et al., 1998). Aunque ambas especies tienen una composición muy semejante, hemos de apuntar que las diferencias en cuanto a genotoxicidad encontradas por diversos autores, se pueden deber a una selección del material diferente, ya que en la obtención de los aceites esenciales influyen factores, tanto agronómicos, como industriales que pueden originar aceites muy diferentes en composición de terpenos debido a una falta de reglamentación o estandarización en la obtención de las muestras (Zhou et al., 2004).



Las infusiones de *M. pulegium* son antigenotóxicas frente el Peróxido de Hidrógeno en el test S.M.A.R.T. (figura 3.6.) con un valor de inhibición de 69 %, así como su aceite cuando es ensayado en este mismo test por Francios y colaboradores (1997) y por Karpouhtsis y colaboradores (1998).

Nuestros resultados de antigenotoxicidad de las dos *mentas* ensayadas frente al Peróxido de Hidrógeno son similares, es decir ninguna de las infusiones es genotóxica y ambas son antigenotóxicas, mientras que los aceites ensayados por diferentes autores no son similares: el aceite esencial de *M. piperita* es mutagénico para Lazutka y colaboradores (2001) y el de *M. pulegium* no es mutagénico para Francios y colaboradores (1997) ni para Karpouhtsis y colaboradores (1998). Los diferentes orígenes y procesos de extracción podrían ser la causa de esta discrepancia.

El extracto etanólico de *M. pulegium* posee actividad antioxidante *in vivo* y puede emplearse en la protección de tejidos del estrés oxidativo. (Jain et al., 2012). Extractos metanólicos de *M. pulegium* mostraron capacidad antioxidante, actividad antioxidante y efectos anti-genotóxicos. Se estudió el efecto antigenotóxico usando el método (SCE) de intercambio de cromátidas hermanas. Como resultado, se han demostrado efectos antigenotóxicos en cultivos de linfocitos humanos que están en función de su capacidad antioxidante (Alpsoy et al., 2011).

3.1.2.3. Plantas con actividad sedante:

T. cordata-V. officinalis

3.1.2.3.1. Resultados de Toxicidad

Los resultados de supervivencia a las distintas concentraciones (25-50-100%) para estas plantas con actividad sedante se muestran en la siguiente figura (figura 3.7.).

T. cordata posee un efecto tóxico medio del 0.27 y *V. officinalis* no presenta toxicidad (sólo un 0.03).

No se tiene ninguna referencia de estudios sobre la toxicidad de la infusión en el caso de *T. cordata*. Sin embargo, *V. officinalis* tomada crónicamente y en grandes cantidades como infusión puede producir hepatitis aguda (Caldwell et al., 1994) posiblemente debido a que los valeprotriatos poseen efectos citotóxicos (Bos et al., 2002). Contrariamente, Tabach et al., (2009) encuentran que la asociación de tres plantas: *Crataegus oxyacantha*, *Passiflora*



incarnata y *V. officinalis* (extracto CPV) administradas en altas dosis y durante un largo período de tiempo no presenta ninguna toxicidad, dato que está de acuerdo con nuestros resultados.

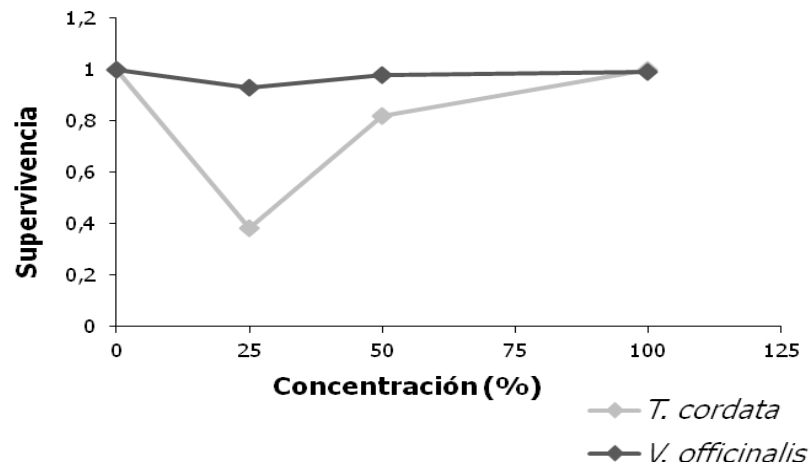


Fig. 3.7. Toxicidad de las plantas consideradas sedantes (expresada en tanto por 1, respecto del control negativo).

3.1.2.3.2. Resultados de Genotoxicidad-Antigenotoxicidad de *T. cordata* y *V. officinalis* frente al Peróxido de Hidrógeno

T. cordata no es mutagénica (0.57 clones/ala) (tabla 3.11.) y es antimutagénica en el ensayo S.M.A.R.T. llevado a cabo por nosotros, inhibiendo el 68% de la mutaciones inducidas por el Peróxido de Hidrógeno (figura 3.8.). Estos resultados completarían los de Yildirim et al. (2000) en los que se pone de manifiesto la elevada capacidad antioxidante de extractos acuosos de *Tilia argentea*.

La infusión de *V. officinalis* no es genotóxica en el test S.M.A.R.T. de alas de *D. melanogaster* (induce 0.58 clones/ala, valor no significativo) (tabla 3.11.) y además es antigenotóxica (figura 3.8.) con un 70% de inhibición de la actividad genotóxica del Peróxido de Hidrógeno. Sin embargo en líneas celulares endoteliales humanas, extractos de la planta obtenidos con diclorometano producen roturas en el ADN, por lo que se consideró genotóxica (Hui-lian et al., 2003). Respecto a esta discrepancia, podemos indicar que, además de haberse ensayado en los organismos modelos diferentes, el sistema de extracción puede tener relación con los resultados genotóxicos obtenidos por estos autores. Nuestros resultados estarían más



próximos a los de Dèciga-Campos et al., (2007) quienes encuentran que otra especie de *Valeriana* (*V. procera*) no es mutagénica en el test de *Salmonella*.

Tabla 3.11. Frecuencia de mutación para cada categoría (pequeños, grandes, gemelos y totales).

Concentración Compuesto (mg/ml) (M)	Número de Alas	Clones por ala (número de clones) diagnosis (1)			
		Clones simples pequeños (1-2 células) m = 2	Clones simples grandes (más de 2 células) m = 5	Clones gemelos m = 5	Clones totales m = 2
<i>T. cordata</i>					
0	40	0.325 (13)	0.025 (1)	0	0.35 (14)
14.65	34	0.5 (17) i	0.029 (1) i	0	0.53 (18) i
29.30	40	0.55 (22) i	0.025 (1) i	0	0.58 (23) i
58.60	40	0.5 (20) i	0.125 (5) i	0	0.625 (25) i
0	30	0.46 (14)	0	0	0.46 (14)
0.12 M H ₂ O ₂	20	0.85 (17) i	0.1 (2) i	0	0.95 (19) +
7.33	40	0.35 (14) -	0.025 (1) i	0.025 (1) i	0.4 (16) -
Combinado	40	0.225 (9) -	0.05 (2) i	0.025 (1) i	0.3 (12) -
<i>V. officinalis</i>					
0	40	0.45 (18)	0.15 (6)	0	0.6 (24)
13.80	44	0.5 (22) -	0.068 (3) -	0	0.57 (25) -
27.60	38	0.26 (10) -	0.237 (9) -	0.026 (1) i	0.53 (20) -
55.20	40	0.475 (19) -	0.175 (7) -	0	0.65 (26) -
0	40	0.45 (18)	0.05 (2)	0	0.5 (20)
0.12 M H ₂ O ₂	39	1.025 (40) +	0.026 (1) i	0.026 (1) i	1.08 (42) +
13.8	40	0.3 75 (15) -	0.025 (1) i	0	0.4 (16) -
Combinado	40	0.25 (10) -	0.025 (1) i	0.025 (1) i	0.3 (12) -
(1) Diagnóstico estadístico de acuerdo con Frei y Würigler (1.988): + (positivo), - (negativo) e i (inconclusivo). m : factor de multiplicación. Niveles de significación $\alpha = \beta = 0.05$, test de una cola sin corrección de Bonferroni.					
NOTA: Los tratamientos combinados consisten en: La concentración de la infusión + 0.12 M H ₂ O ₂ .					

Para *T. cordata* vemos un aumento progresivo dosis dependiente de clones totales para el 25-50-100% de su concentración; sin embargo para *V. officinalis* observamos que aumenta la frecuencia en 25%, disminuye a 50% para aumentar en 100%, aunque las dos primeras concentraciones inducen incluso menos clones que el control negativo.



La tasa de mutación de 0.65 en la concentración más elevada de *V. officinalis*, debida fundamentalmente a un incremento de clones de gran tamaño, se podría haber alcanzado a causa del contenido del flavonoide *Quercitina*, que ya había sido encontrado débilmente mutagénico en el test S.M.A.R.T. (Graf et al., 1994).

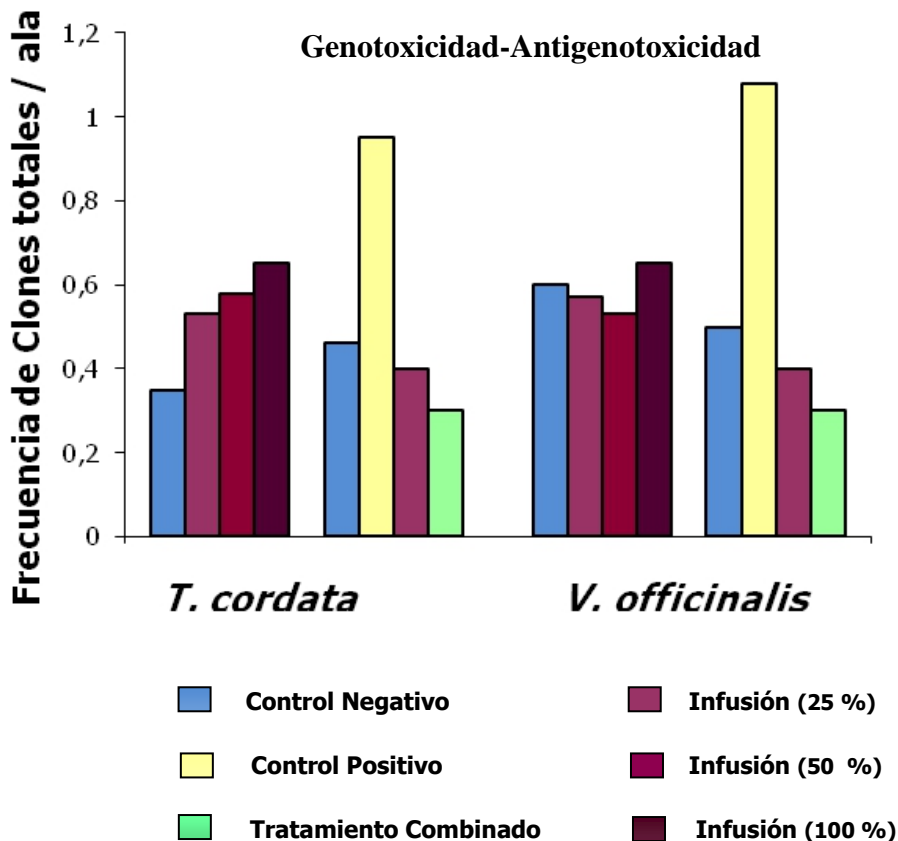


Figura 3.8. Resultados de Genotoxicidad y Antigenotoxicidad de las plantas del estudio consideradas sedantes.

T. cordata y *V. officinalis* son antimutagénicas frente al Peróxido de Hidrógeno como genotoxina, al igual que el resto de las infusiones ensayadas, siendo nuestros resultados los primeros que se obtienen sobre esta actividad biológica genoprotectora de ambas plantas en infusión.

Una primera revisión de los resultados nos informa que todas las infusiones ensayadas, sin excepción, han sido antimutagénicas frente a los daños que produce el Peróxido de



Hidrógeno en el test S.M.A.R.T. Además se observa una reducción de la frecuencia de clones totales en todos los casos, excepto en *U. tomentosa*, por debajo del control negativo (agua y medio de cultivo).

El efecto fuertemente antimutagénico de las infusiones probadas por nosotros, era esperable, debido a su uso como antiinflamatorios en muchos casos y a la relación con la producción de especies reactivas de oxígeno que conllevan las inflamaciones (Fitzpatrick, 2001).

El medio de cultivo instantáneo usado para los tratamientos (North Carolina) es completo y posee, como todo alimento, elementos derivados del nitrógeno que pueden generar especies reactivas de nitrógeno. La tasa de mutación basal en los controles negativos contaría con estas y otras moléculas potencialmente mutagénicas, además de las mutaciones espontáneas. Las infusiones de las plantas medicinales estudiadas, a las concentraciones ensayadas por nosotros no sólo no son mutagénicas sino que resultan con una frecuencia levemente inferior a la de sus controles concurrentes. Este efecto reductor a bajas concentraciones puede deberse al alto contenido en fenoles de las infusiones.

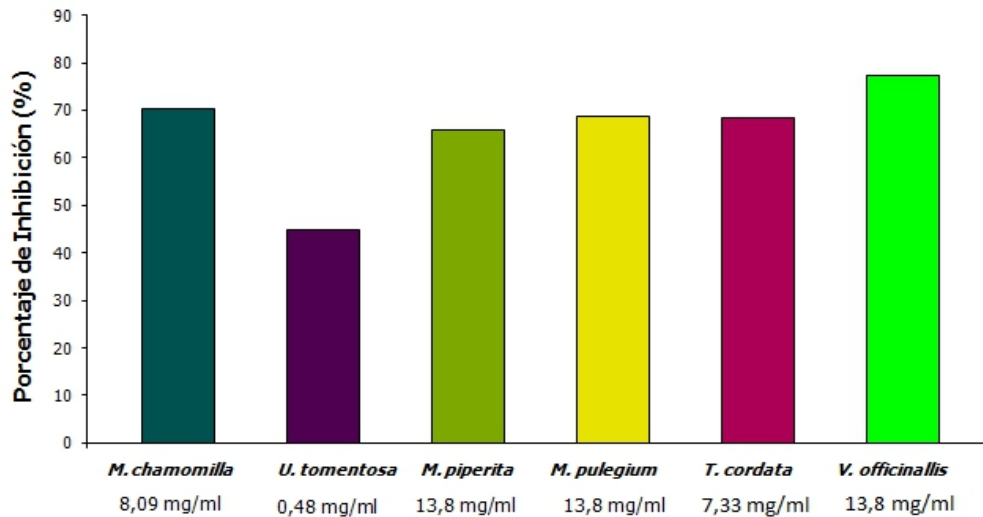


Fig. 3.9. Inhibición de efectos genotóxicos del Peróxido de Hidrógeno por las plantas sometidas a estudio.



3.1.3. Estudio de los Fenoles de las Plantas medicinales seleccionadas

Las sustancias químicas de las plantas, base de numerosos medicamentos, se extrajeron y aislaron por primera vez en el siglo XVIII. Y ha sido precisamente a lo largo de estos dos últimos siglos cuando la botánica y el conocimiento de las plantas medicinales han adquirido su gran desarrollo. Así, ya en pleno siglo XX, el médico francés H. Leclerc desarrolló el concepto de "Fitoterapia": la ciencia que se ocupa del uso de las plantas medicinales en el tratamiento de las enfermedades.

Desde entonces esta ciencia ha continuado desarrollándose y beneficiándose de un número ingente de plantas: se calcula que existen unas 25.000 especies de plantas medicinales (en la actualidad, más de la mitad de los medicamentos siguen teniendo a estas plantas como ingrediente principal) y que en las selvas tropicales todavía hay entre 250.000 y 500.000 especies con propiedades medicinales por catalogar.

Los fenoles vegetales son antioxidantes y beneficiosos en prevención del cáncer, aunque también pueden exhibir propiedades no saludables (e.g. provocar subalimentación por inhibición de absorción del hierro de alimentos; (Hurrell et al., 2004)). Se han descrito efectos mutagénicos de ciertos flavonoides utilizando ensayos en procariotas (Jurado et al., 1991) y en eucariotas (Graf et al., 1994). Son muy variados los mecanismos que se proponen para esta actividad mutagénica de los polifenoles: la rotura de ADN y generación de especies reactivas de oxígeno, catalización de nitrosilación, inhibición de topoisomerasas, producción de aneuploidías y poliploidías (Ferguson, 2001).

Estos antioxidantes naturales, en ciertas condiciones pueden ejercer actividades prooxidantes tóxicas (Rietjens et al., 2002). Por ello es de actual interés evaluar el efecto dual de estos agentes fitoquímicos.

Una vez evaluada la toxicidad, la genotoxicidad y el potencial antigenotóxico de las seis plantas medicinales seleccionadas (*M. chamomilla*, *M. piperita*, *M. pulegium*, *T. cordata*, *V. officinalis*, y *U. tomentosa*) (Romero-Jiménez et al., 2005), podemos buscar las causas de sus diversas capacidades entre sus componentes activos, fenólicos y terpenos en su mayoría. Por ello, la siguiente fase de nuestro trabajo ha sido estudiar el papel de ciertos fenoles en los efectos observados en las plantas completas. Para ello se llevaron a cabo ensayos de toxicidad, genotoxicidad y antigenotoxicidad utilizando el sistema de detección *in vivo* de mutaciones somáticas y de recombinaciones (S.M.A.R.T.) de *D. melanogaster* (Graf et al., 1984).



Para dilucidar el papel protector de los fenoles se han llevado a cabo en un primer paso, tres tipos de ensayos de antígenotoxicidad: un tratamiento combinado, un pretratamiento con el Peróxido de Hidrógeno y un pretratamiento con el fenol a ensayar. Ya que se sabe que los fenoles destoxifican actuando como aceptores finales o terminators de otros radicales libres.

3.1.3.1. Fenoles de Plantas con actividad antiinflamatoria (*M. chamomilla-U. tomentosa*): *Bisabolol*-*Apigenina*- *Ac. Protocatecuico*

Hemos seleccionado los fenoles el *Bisabolol*, *Apigenina* y *Ácido Protocatecuico* (*DHBA*) como posibles candidatos para explicar la potencia desmutagénica de las plantas *M. chamomilla* y *U. tomentosa* respectivamente. La figura 3.10. muestra los resultados obtenidos en los ensayos de toxicidad del *Bisabolol*, la *Apigenina* y el *DHBA*.

3.1.3.1.1. Resultados de Toxicidad

La supervivencia para el tratamiento con *Bisabolol* es prácticamente del 100% en *D. melanogaster* (8% de toxicidad media). El *Bisabolol* también se ha ensayado frente a células normales de glía en ratas, observándose que no afecta a la viabilidad de las mismas (Cavaliere et al., 2004). Ambos datos apoyan la propuesta del bisabolol como una sustancia no tóxica a poder ser usada en quimioprevención.

El *DHBA* es moderadamente tóxico para las larvas de *D. melanogaster* en nuestros ensayos, estando la supervivencia media por encima del 75%. Zhang et al., (2010) encontraron que el *DHBA* es una sustancia neuroprotectora. Posteriormente, los resultados de Guan et al., (2011) revelan que el *DHBA* promueve la diferenciación neuronal y la supervivencia a través de la mediación de enzimas antioxidantes endógenos, indicando estos estudios que este fenol simple es capaz de atravesar la barrera hematoencefálica, actividad que no todas las sustancias tienen. Tsai y Yin, (2012) encuentran concretamente que la ingesta de *DHBA* disminuye la sobreexpresión de TNF-alfa e IL-6, y que ello mitigaría el estrés inflamatorio en cerebro. También se ha conseguido poner de manifiesto la actividad antiinflamatoria y antioxidante de este fenol en la lucha contra el deterioro diabético en ratones (Lin et al., 2011). Nuestros resultados estarían parcialmente de acuerdo con estas evidencias, ya que todos los autores consultados señalan una protección neuronal y nosotros encontramos toxicidad débil o moderada.

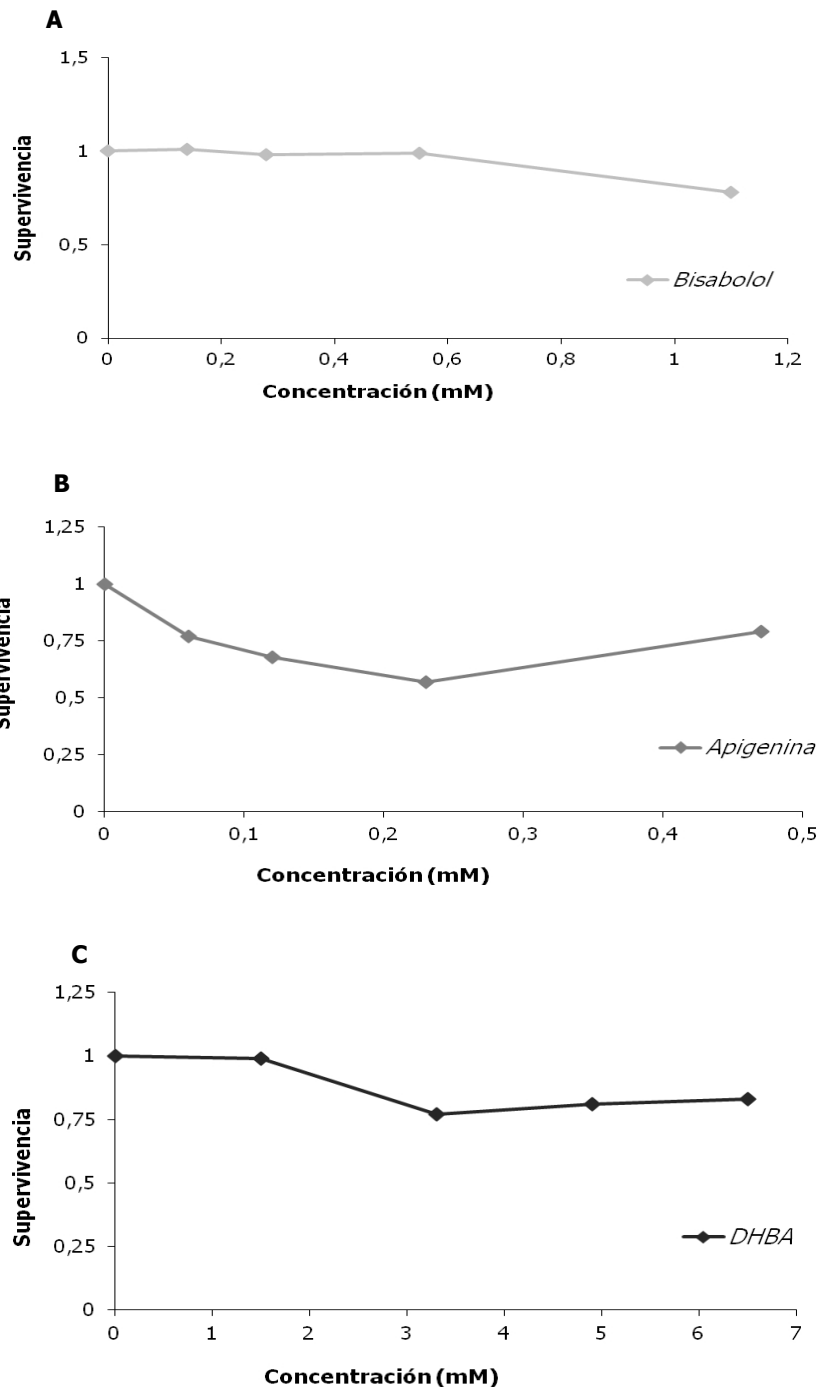


Fig. 3.10. Curvas de supervivencia en tanto por 1, respecto al control, de los fenoles representativos de las plantas medicinales con propiedades antiinflamatorias.



Cárdenas et al., (2006) no han detectado actividad de *la Apigenina* frente a células normales mamarias ni fibroblásticas de ratón, aunque anteriormente Harbone y Williams, (2000) detectaron inhibición del crecimiento de fibroblastos. Aunque en nuestros experimentos de toxicidad no se ha alcanzado la DL50 para este fenol, sí observamos toxicidad a altas concentraciones.

3.1.3.1.2. Resultados de Genotoxicidad-Antigenotoxicidad de los Fenoles de las plantas medicinales antiinflamatorias seleccionadas frente al mutágeno

Las tablas 3.12., 3.13., y 3.14. muestran los resultados obtenidos en los ensayos de genotoxicidad del *Bisabolol*, la *Apigenina* y el DHBA, así como su antigenotoxicidad frente al Peróxido de Hidrógeno, y los resultados de los pre-tratamientos y post-tratamientos frente al mutágeno.

Con la idea de intentar comprender los mecanismos de acción de los fenoles, hemos probado por primera vez otro tipo de ensayo de genotoxicidad con pretratamientos que es idéntico a una prueba estándar de antigenotoxicidad, donde previamente se han tratado las larvas bien con el mutágeno bien con el fenol, para después continuar el tratamiento crónico con fenol, o con mutágeno respectivamente. Los pretratamientos fenol/mutágeno y mutágeno/fenol nos darán una idea sobre si el efecto benéfico del fenol ensayado es anterior o posterior al tratamiento con el mutágeno, dado que no podemos saberlo en un tratamiento combinado.

Los resultados de la genotoxicidad y antigenotoxicidad del *Bisabolol* nos muestran que este fenol no es mutagénico a las concentraciones ensayadas, obteniendo una frecuencia media de clones totales de 0.22, inferior incluso a su control concurrente. Además de ser seguro, ha mostrado ejercer una acción antimutagénica frente al daño causado por el Peróxido de Hidrógeno, oscilando el porcentaje de inhibición entre el 42 y 51%. Nuestros resultados corroboran los de Gomes-Careneiro et al. (2005) que encontraron que el *Bisabolol* no es mutagénico e induce una reducción del efecto mutagénico contra mutágenos que actúan indirectamente en el sistema procariota *Salmonella* y también los del trabajo de Hernández-Ceruelos et al. (2004) que mostraron que el aceite de esencial de *M. chamomilla* es capaz de bloquear los intercambios entre cromátidas hermanas inducidos por daunorubicina y metilmetanosulfonato en la células de la médula ósea de ratón. Se piensa que el *Bisabolol* induce una reducción dosis-dependiente del efecto mutagénico cuando se ensaya contra mutágenos que actúan indirectamente, aunque este efecto no es evidente contra los



mutágenos directos que no requieren de activación metabólica. Puede ser que este fenol actúe inhibiendo la conversión metabólica de los promutágenos a sus metabolitos (Gomes-Carneiro et al, 2005).

Tabla 3.12. Resultados de genotoxicidad y antigenotoxicidad del *Bisabolol* frente al Peróxido de Hidrógeno, y pre-tratamiento/post-tratamientos de 1 hora de Peróxido de Hidrógeno y *Bisabolol*.

Concentración Compuesto (M)	Núm. de Alas	Clones por ala (número de clones) diagnóstico (1)			
		Clones simples pequeños (1-2 células) m = 2	Clones simples grandes (más de 2 células) m = 5	Clones gemelos m = 5	Clones totales m = 2
Bisabolol					
0	34	0.2 (7)	0.03 (1)	0	0.23 (8)
0.14 x 10 ⁻³	40	0.15 (6) i	0.02 (1) i	0	0.17 (7) -
1.1 x 10 ⁻³	40	0.22 (9) i	0.05 (2) i	0	0.27 (11) i
Combinado					
0	34	0.2 (7)	0.03 (1)	0	0.23 (8)
0.12 H ₂ O ₂	40	0.5 (20) +	0.05 (2) i	0	0.55 (22) +
0.14 x 10 ⁻³	40	0.32 (13) i	0	0	0.32 (13) i
1.1 x 10 ⁻³	40	0.27 (11) i	0	0	0.27 (11) i
Tratamientos -1 hora					
Pre-tratamiento					
0	34	0.2 (7)	0.03 (1)	0	0.23 (8)
0.12 H ₂ O ₂	40	0.42 (17) i	0.02 (1) i	0	0.45 (18) i
0.14 x 10 ⁻³	40	0.37 (15) i	0	0	0.37 (15) i
1.1 x 10 ⁻³	40	0.22 (9) i	0.05 (2) i	0.02 (1) i	0.30 (12) i
Post-tratamiento					
0	34	0.2 (7)	0.03 (1)	0	0.23 (8)
0.12 H ₂ O ₂	40	0.5 (20) +	0.05 (2) i	0	0.55 (22)+
0.14 x 10 ⁻³	40	0.2 (8) i	0.02 (1) i	0	0.22 (9) i
1.1 x 10 ⁻³	40	0.27 (11) i	0.02 (1) i	0.02 (1) i	0.32 (11) i

(1) Diagnóstico estadístico de acuerdo con Frei y Würzler (1.988): + (positivo), - (negativo) e i (inconclusivo). m: factor de multiplicación. Niveles de significación $\alpha = \beta = 0.05$, test de una cola sin corrección de Bonferroni.

La *Apigenina* es un flavonoide no tóxico con propiedades que inhiben la promoción de los tumores e induce la apoptosis en células cancerosas. Observando los resultados para los ensayos de genotoxicidad y antigenotoxicidad llevados a cabo con la *Apigenina*, podemos también afirmar que la *Apigenina* no sólo es segura, no es genotóxica, induciendo una tasa de



mutaciones totales por ala inferior al control (0.32 y 0.15 para las dos concentraciones ensayadas), sino que también es antigenotóxica y se comporta como un potente antimutágeno contra el Peróxido de Hidrógeno en el Test de Mutación y Recombinación Somática en tratamientos combinados según nos muestra la tabla 3.13.

Tabla 3.13. Resultados de genotoxicidad y antigenotoxicidad de la *Apigenina* frente al Peróxido de Hidrógeno, y pre-tratamiento/post-tratamientos de 1 hora de Peróxido de Hidrógeno y *Apigenina*.

Concentración Compuesto (M)	Núm. de Alas	Clones por ala (número de clones) diagnosis (1)			
		Clones simples pequeños (1-2 células) m = 2	Clones simples grandes (más de 2 células) m = 5	Clones gemelos m = 5	Clones totales m = 2
Apigenina					
0	40	0.175 (7)	0.05 (2)	0.02 (1)	0.25 (10)
0.06×10^{-3}	40	0.27 (11) i	0.05 (2) i	0	0.32 (13) i
0.47×10^{-3}	40	0.07 (3) -	0.07 (3) i	0	0.15 (6) -
Combinado					
0	40	0.17 (7)	0.05 (2)	0.025 (10)	0.25 (10)
0.12 H ₂ O ₂	40	0.5 (20) +	0.05 (2) i	0	0.55 (22) +
0.12×10^{-3}	40	0.30 (11) i	0	0.05 (2) i	0.36 (13) i
0.47×10^{-3}	40	0.27 (11) i	0.02 (1) i	0	0.25 (10) i
Tratamientos -1 hora					
Pre-tratamiento					
0	40	0.17 (7)	0.05 (2)	0.02 (1)	0.25 (10)
0.12 H ₂ O ₂	40	0.42 (17) +	0.02 (1) i	0	0.45 (18) i
0.06×10^{-3}	40	0.3 (12) i	0	0.02 (1) i	0.32 (13) i
0.47×10^{-3}	40	0.2 (8) i	0.02 (1) i	0	0.22 (9) i
Post-tratamiento					
0	40	0.17 (7)	0.05 (2)	0.02 (1)	0.25 (10)
0.12 H ₂ O ₂	40	0.5 (20) +	0.05 (2) i	0	0.55 (22) +
0.06×10^{-3}	40	0.15 (6) i	0.02 (1) i	0	0.17 (7) -
0.47×10^{-3}	30	0.23 (7) i	0.03 (1) i	0	0.26 (8) i
(1) Diagnóstico estadístico de acuerdo con Frei y Würzler (1.988): + (positivo), - (negativo) e i (inconclusivo). m: factor de multiplicación. Niveles de significación $\alpha = \beta = 0.05$, test de una cola sin corrección de Bonferroni.					

El rango de inhibición de la *Apigenina* ha sido dependiente de la dosis y oscila entre el 34 y 52% (figura 3.11.), con una media de potencia antimutagénica del 43% para las concentraciones ensayadas. La capacidad antimutagénica de la *Apigenina* no ha sido ensayada



en células somáticas de *Drosophila* en proliferación hasta el presente trabajo. Sí se han llevado a cabo ensayos de antigenotoxicidad para la *Apigenina* en *Salmonella thyphimurium* (Miyazawa y Hisama, 2003; Birt et al., 1986; Hashemi et al., 2010) y en el sistema eucariótico de células de ovario de hámster chino (Kuo et al, 1992), encontrándose siempre que es antigenotóxica; además tiene un efecto radioprotector dependiente de la dosis en linfocitos humanos (Rithidech et al, 2005). Solamente Noel et al. (2006) detectan efectos clastogénicos en el ensayo de micronúcleos de ratón a elevadas dosis. Nosotros podemos por tanto confirmar que la *Apigenina* se comporta como un inactivador de las especies reactivas de oxígeno en el modelo S.M.A.R.T. de *Drosophila*.

Los resultados obtenidos en los ensayos de genotoxicidad /antigenotoxicidad del Ácido Protocatecuico (DHBA) se pueden observar en la siguiente tabla (tabla 3.14.). El DHBA es el constituyente fenólico simple mayoritario de *U. tomentosa* (Gonçalves et al., 2005) y se piensa que sus efectos beneficiosos sobre la salud están asociados a su actividad antioxidante (Jayaprakasha et al, 2006), que se ha comprobado es tan elevada como la muy conocida de los fenoles contenidos en el aceite de oliva virgen extra (Masella et al., 1999). Esta actividad incluye la inhibición de la generación de radicales libres así como la regulación de enzimas que participan en la neutralización de tales radicales. Pero los efectos biológicos del *DHBA* son contradictorios en cuanto a genotoxicidad se refiere, ya que se sabe que induce alteraciones al nivel cromosómico en células de ovario de hámster chino (Yen y Hsieh, 2000). Podemos indicar que el efecto del *DHBA* es dual y dosis-dependiente, ya que según su concentración exhibe actividades antioxidantes y prooxidantes (Makris y Rossiter, 2001).

Los resultados de genotoxicidad/antigenotoxicidad del *DHBA* en el test S.M.A.R.T. de *D. melanogaster* corroboran los de la bibliografía. Este potente test ha puesto en evidencia los dos efectos contradictorios (antioxidante/prooxidante) de este fenol. Nuestros datos muestran que no es genotóxico a altas concentraciones con 0.39 clones/ala (aunque está en el umbral del diagnóstico para genotoxicidad). Se sabe que el DHBA induce peroxidación lipídica dependiente del ciclo redox Fe²⁺/Fe³⁺ (que es mutagénica) y daño oxidativo en el ADN dependiente del ciclo redox Cu⁺¹/Cu⁺² (Nakamura et al., 2000 b).

Por otro lado se puede observar en la gráfica (figura 3.11.) que es capaz de inhibir hasta un 38% la actividad genotóxica del Peróxido de Hidrógeno en tratamientos combinados, siendo efecto dependiente de la dosis. También existen referencias de su actividad antigenotóxica, ya que el DHBA inhibe el daño oxidativo en el ADN inducido por Fe²⁺ (Lodovici et al., 2001), y la escisión de las cadenas de ADN originada por los radicales hidroxilo (Ueda et al., 1996).



Nosotros emitimos nuestra hipótesis, de acuerdo con nuestros resultados y tomando los trabajos anteriores hechos sobre la toxicidad del DHBA como referencia, de que este fenol tiene una actividad dosis-dependiente, ya que ejerce un efecto protector contra el estrés oxidativo en concentraciones bajas (Liu et al., 2002), mientras que induce un estrés oxidativo en animales de laboratorio a concentraciones elevadas (Nakamura et al., 2001 a; Nakamura et al., 2001 b).

Tabla 3.14. Resultados de genotoxicidad y antigenotoxicidad del *DHBA* frente al Peróxido de Hidrógeno, y pre-tratamiento/post-tratamientos de 1 hora de Peróxido de Hidrógeno y *DHBA*.

Concentración Compuesto (M)	Núm. de Alas	Clones por ala (número de clones) diagnosis (1)			
		Clones simples pequeños (1-2 células) m = 2	Clones simples grandes (más de 2 células) m = 5	Clones gemelos m = 5	Clones totales m = 2
DHBA					
0	40	0.12 (5)	0.05 (2)	0	0.17 (7)
1.6×10^{-3}	40	0.3 (12) i	0	0	0.3 (12) i
6.5×10^{-3}	38	0.36 (14) +	0.02 (1) i	0	0.39 (15) i
Combinado					
0	40	0.12 (5)	0.05 (2)	0	0.17 (7)
0.12 H ₂ O ₂	40	0.5 (20) +	0.05 (2) i	0	0.55 (22) +
1.6×10^{-3}	40	0.22 (9) i	0.07 (3) i	0.05 (2) i	0.35 (14) i
6.5×10^{-3}	12	0.33 (4) i	0	0	0.33 (4) i
Tratamientos -1 hora					
Pre-tratamiento					
0	40	0.22 (9)	0.02 (1)	0.02 (1)	0.27 (11)
0.12 H ₂ O ₂	40	0.42 (17) i	0.02 (1) i	0	0.45 (18) i
1.6×10^{-3}	26	0.29 (7) i	0.03 (1) i	0	0.3 (8) i
6.5×10^{-3}	40	0.10 (2) -	0	0	0.1 (2) -
Post-tratamiento					
0	40	0.22 (9)	0.02 (1)	0.02 (1)	0.27 (11)
0.12 H ₂ O ₂	40	0.5 (20) +	0.05 (2) i	0	0.55 (22) +
1.6×10^{-3}	40	0.4 (16) i	0	0	0.4 (16) i
6.5×10^{-3}	40	0.3 (12) i	0.05 (2) i	0	0.35 (14) i
(1) Diagnóstico estadístico de acuerdo con Frei y Würzler (1.988): + (positivo), - (negativo) e i (inconclusivo). m : factor de multiplicación. Niveles de significación $\alpha = \beta = 0.05$, test de una cola sin corrección de Bonferroni .					



Los pretratamientos con *Apigenina* y *Bisabolol* han exhibido porcentajes de inhibición (69.09% a dosis de 0.46 mM y 60% a 0.56 mM respectivamente) más altos que los del tratamiento combinado con Peróxido de Hidrógeno. El efecto antimutagénico fue más significativo, reduciendo el número de clones/ala simples y el de totales. Nosotros sugerimos que esto podría ser debido fundamentalmente a un mecanismo protector directo de los radicales libres generados por el Peróxido de Hidrógeno secuestrándolas, y en menor medida a la inhibición de enzimas que incluyen a las oxidasas y oxigenasas. El porcentaje de inhibición para los ensayos de post-tratamientos con *DHBA* (90.09%) ha sido mayor que en los ensayos de pretratamiento (36.36%) Este fenol parece proteger del daño oxidativo inducido por el Peróxido de Hidrógeno fundamentalmente por rutas de inhibición enzimáticas (Nakamura et al., 2000, b). Estos resultados indican que los fenoles no pueden revertir a los niveles del control todo el daño genético inducido por el mutágeno de tipo oxidativo, pero sí en un porcentaje significativo.

A la vista de los resultados obtenidos para los pre y post-tratamientos con estos tres fenoles, que nos indican que la *Apigenina* y el *Bisabolol* exhiben sus porcentajes de inhibición mayores en los pretratamientos fenólicos y que el *Ácido Protocatecuico* lo hace en los pretratamientos con el Peróxido de Hidrógeno, decidimos usar los tratamientos combinados para el resto de fenoles, ya que el tiempo que se consumiría en realizar los análisis por triplicado nos hubiera impedido realizar el rastreo en los 8 fenoles seleccionados

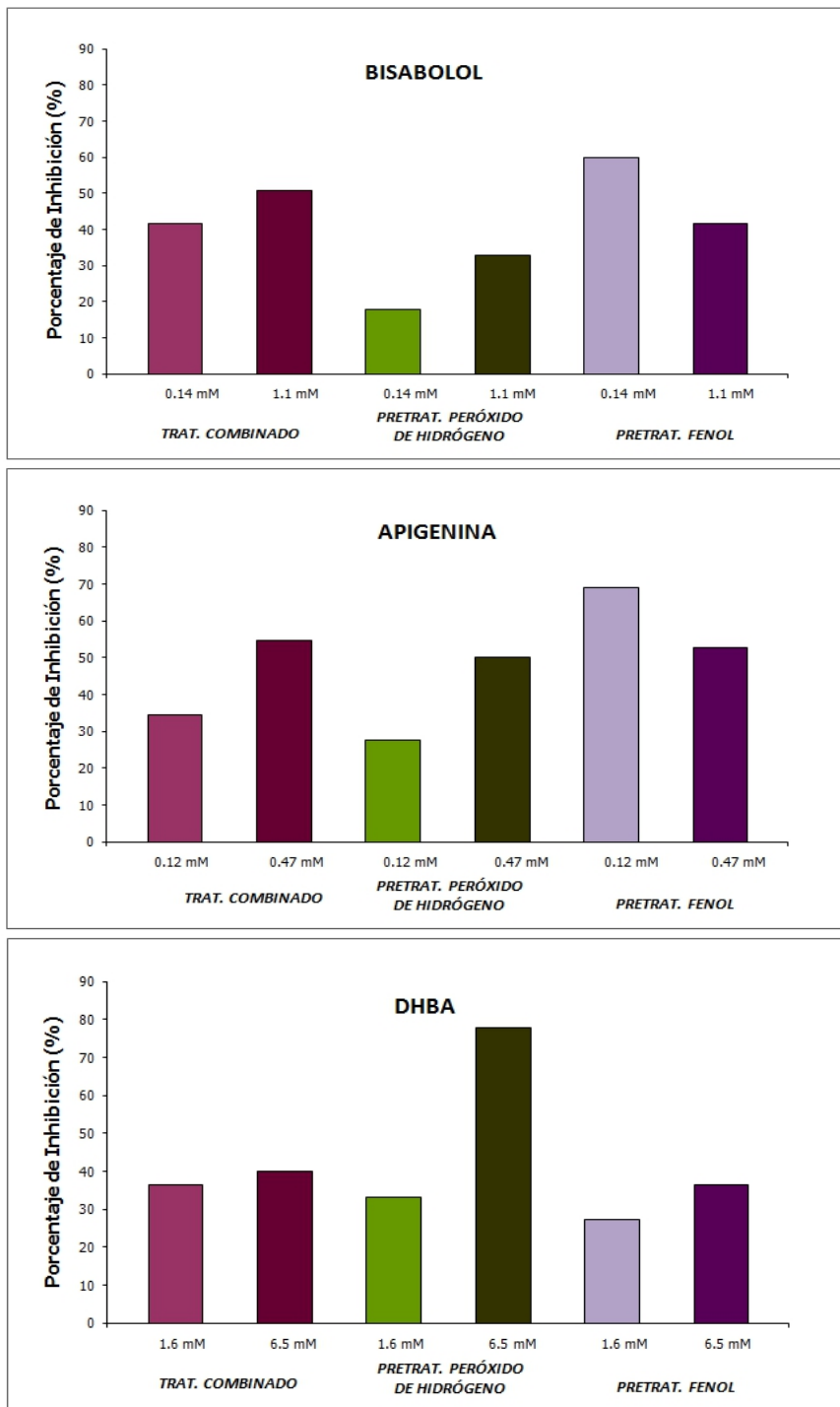


Fig. 3.11. Inhibición de la genotoxicidad del Peróxido de Hidrógeno por los fenoles estudiados de las plantas antiinflamatorias.



3.1.3.2. Fenoles de Plantas con actividad digestiva (*M. piperita*-*M. pulegium*): *Mentol*-*Pulegona*

Hemos seleccionado los fenoles *Mentol* y *Pulegona* como posibles moléculas causantes de la actividad biológica estudiada en las plantas medicinales digestivas seleccionadas. La figura 3.12. muestra los resultados obtenidos en los ensayos de toxicidad de estos fenoles.

3.1.3.2.1. Resultados de Toxicidad

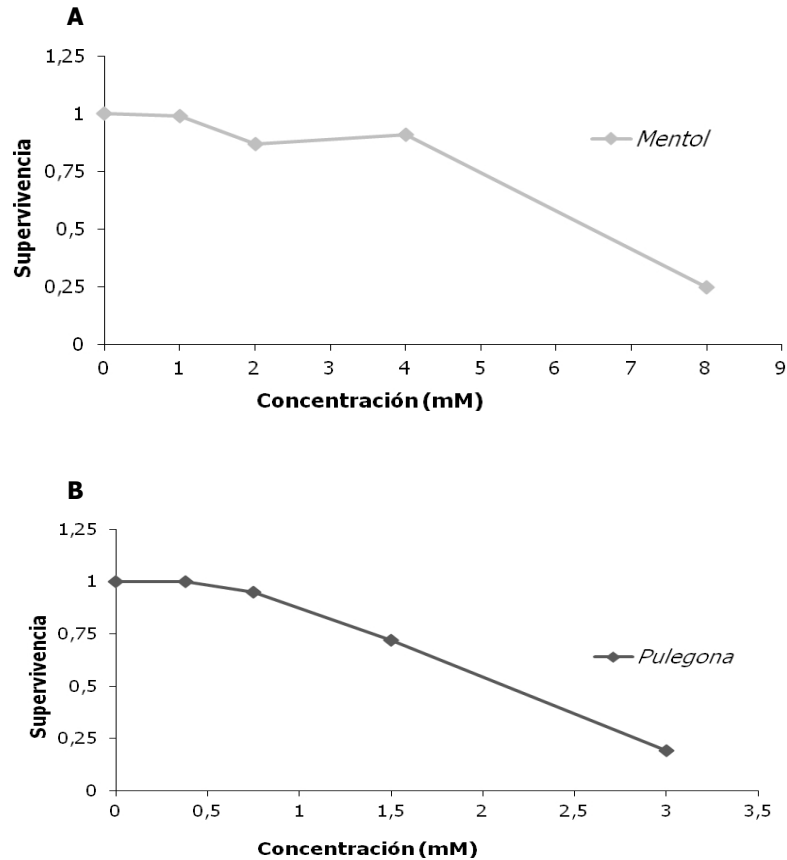


Fig. 3.12. Curvas de supervivencia en tanto por 1, respecto al control, de los fenoles más representativos de las plantas medicinales con propiedades digestivas.

En estos dos fenoles se observa un descenso de la supervivencia claro con el aumento de la concentración ensayada, siendo el *Mentol* menos tóxico que la *Pulegona* para las larvas de *D. melanogaster*. Se sabe que mentol es tóxico también para los eritrocitos y las membranas celulares en general (Mendanha et al., 2013; Bernson y Pettersson, 1983). La



Pulegona también es tóxica para el hígado, cerebro y pulmones en roedores (Thorup et al., 1983; Anderson et al., 1996; Gordon et al., 1982), al igual que en nuestros ensayos en *D. melanogaster*.

3.1.3.2.2. Resultados de Genotoxicidad-Antigenotoxicidad de los Fenoles de las plantas medicinales digestivas seleccionadas frente al mutágeno

El **Mentol** no es genotóxico (tabla 3.15.) en el test S.M.A.R.T. en alas de *D. melanogaster*. Las frecuencias de mutaciones totales por ala han sido inferiores a las de su control concurrente para las dos concentraciones ensayadas (0.25 y 0.38 respectivamente).

Tabla 3.15. Resultados de genotoxicidad y antigenotoxicidad del *Mentol* y *Pulegona* frente al Peróxido de Hidrógeno.

Concentración Compuesto (M)	Núm. de Alas	Clones por ala (número de clones) diagnosis (1)			
		Clones simples pequeños (1-2 células) m = 2	Clones simples grandes (más de 2 células) m = 5	Clones gemelos m = 5	Clones totales m = 2
Controles					
H ₂ O	39	0.23 (9)	0.026 (1)	0.026 (1)	0.28 (11)
0.65 Et-OH	40	0.4 (16) i	0	0.025 (1) i	0.43 (17) i
0.12 H ₂ O ₂	40	0.5 (20) +	0	0.025 (1) i	0.53 (21) i
Mentol					
1 x 10 ⁻³	40	0.2 (8) -	0.05 (2) i	0	0.25 (10) -
8 x 10 ⁻³	8	0.25 (2) i	0.125 (1) i	0	0.38 (3) i
Pulegona					
0.38 x 10 ⁻³	32	0.31 (10) -	0.094 (3) i	0	0.41 (13) -
3 x 10 ⁻³	12	0.67 (8) i	0.083 (1) i	0	0.75 (9) i
TRATAMIENTO COMBINADO					
Mentol					
1 x 10 ⁻³	34	0.41 (14) -	0.09 (3) i	0	0.5 (17) i
4 x 10 ⁻³	12	0.42 (5) i	0	0	0.42 (5) i
Pulegona					
0.38 x 10 ⁻³	30	0.5 (15) i	0.07 (2) i	0	0.57 (17) i
3 x 10 ⁻³	10	0.4 (4) i	0.2 (2) +	0.1 (1) i	0.7 (7) i
(1) Diagnóstico estadístico de acuerdo con Frei y Würzler (1.988): + (positivo), - (negativo) e i (inconclusivo). m: factor de multiplicación. Niveles de significación $\alpha = \beta = 0.05$, test de una cola sin corrección de Bonferroni.					



Nuestros resultados están de acuerdo con los de Murthy et al., (1991) y los de Gomes-Carneiro et al., (1998) quienes no detectan SCE en linfocitos humanos ni detectan genotoxicidad en el test de Ames con o sin bioactivación respectivamente; aunque en hámster chino sí se ha observado actividad genotóxica ensayando el test del cometa (Kiffe et al., 2003). Contrariamente, nosotros hemos detectado actividad antigenotóxica moderada del *Mentol* (13% de inhibición) contra las mutaciones originadas por el Peróxido de Hidrógeno.

La tabla 3.15. muestra cómo la *Pulegona* no es genotóxica en el ensayo S.M.A.R.T., aunque se alcanzan valores elevados de mutaciones totales por ala (0.75 para la concentración más elevada). Hemos de señalar que, aunque la *Pulegona* no sea genotóxica en nuestros ensayos, sí ha sido la que más alta frecuencia de mutación total ha inducido en *D. melanogaster*, superando al control positivo de Peróxido de Hidrógeno (0.53 mutaciones/ala). Existen indicios de que son los metabolitos p-cresol y metofurano, los responsables de su toxicidad, disminuyendo la concentración de glutatión, entre otros efectos (Gordon et al., 1987; Thomasen et al., 1991; Zhou et al., 2004). Recientemente, el Programa Nacional de Toxicología ha encontrado los siguientes índices de genotoxicidad para la *Pulegona*: no es mutagénica en el test de *S. typhimurium* usando las estirpes TA97, TA98, TA100, and TA1535 con y sin activación metabólica, aunque en otros ensayos independientes del mismo programa usando TA98 y TA100 de *S. typhimurium* y WP2 uvrA/pKM101 de *E. coli*, se han obtenido resultados positivos. Sin embargo fue no mutagénica en el test de micronúcleos de ratones tanto en machos como en hembras B6C3F1.

La tabla 3.15. y la figura 3.12. muestran cómo la *Pulegona* no tiene actividad antigenotóxica.

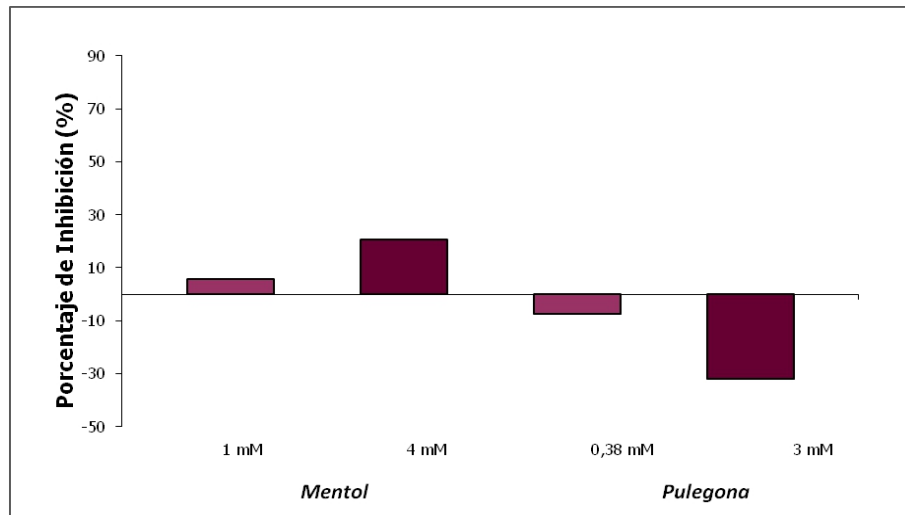


Fig. 3.12. Inhibición de la genotoxicidad del Peróxido de Hidrógeno por los fenoles estudiados de las plantas digestivas.

Sin embargo, el metabolismo de la *Pulegona* no es tan simple ya que, *in vivo*, se han identificado y caracterizado 14 metabolitos que actúan en la *fase I* y 10 que actúan en la *fase II* de la bioactivación metabólica, por lo que podría tener un efecto dualista en el resultado final de la genotoxicidad de plantas que la contengan. La figura 3.13. recoge las rutas metabólicas esenciales de este terpeno, pudiéndose apreciar que los metabolitos secundarios se unen covalentemente a proteínas que intervendrían en la regulación de la expresión génica entre otros mecanismos. La presencia de otros fenoles, además de la pulegona, en las dos mentas ensayadas, y con efectos beneficiosos, explicaría los valores límite de este fenol en *D. melanogaster*.



obstrucción urinaria (Lamson y Brignall, 2000). Nuestros resultados están de acuerdo con la mayoría de las experiencias realizadas con este fenol tanto en animales in vivo como en ensayos clínicos con humanos.

El **Limoneno** no es tóxico para *Drosophila* a las concentraciones más altas ensayadas. Sólo hemos encontrado una referencia en la que se muestra que puede causar toxicidad, concretamente hemolisis en roedores, produciendo lesiones celulares (Mendanha et al., 2013).

El **Ácido Valerénico** no es tóxico para *D. melanogaster*. Estos resultados para el componente mayoritario de la Valeriana, explican el mismo comportamiento que la planta para el ensayo de toxicidad.

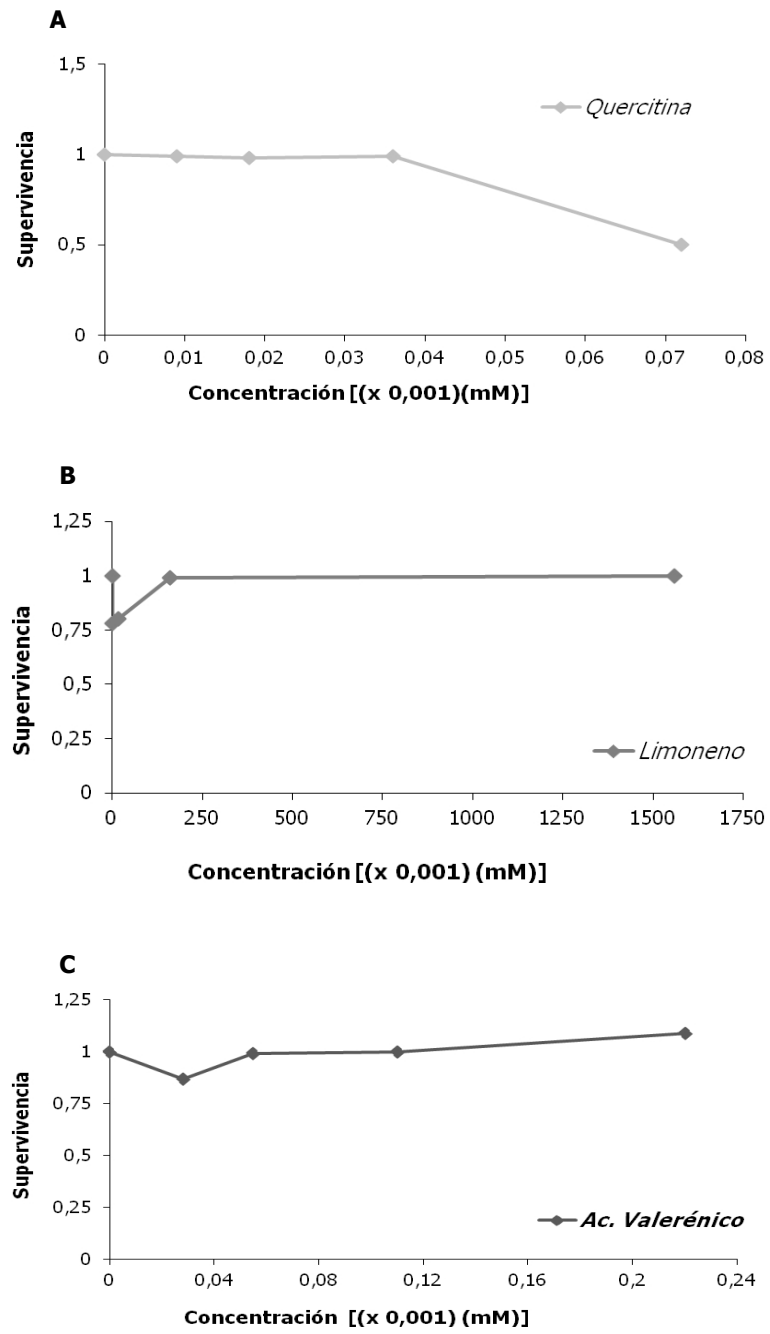


Fig. 3.14. Curvas de supervivencia en tanto por 1, respecto al control, de los fenoles más representativos de las plantas medicinales con propiedades sedantes.



3.1.3.3.2. Resultados de Genotoxicidad-Antigenotoxicidad de los Fenoles de las plantas medicinales sedantes seleccionadas frente al mutágeno

La *Quercitina* no es genotóxica en los ensayos de mutación y recombinación somáticas en discos imaginales alares de *D. melanogaster* llevados a cabo en el presente trabajo. Las tasas de mutación para las concentraciones de 0.009×10^{-6} M y 0.072×10^{-6} M han sido de 0.3 y 0.41 clones/ala respectivamente. La *Quercitina* ha resultado mutagénica en este mismo ensayo, cuando se han probado concentraciones más elevadas entre 0.05mM y 5mM (Graf et al., 1994), por lo que se pone de manifiesto la importancia de la dosis cuando se trata de comparar resultados incluso del mismo tipo de ensayo. Otros autores han mostrado la seguridad de la *Quercitina* respecto al daño genético en otros ensayos como el del cometa en células HepG2 (Ramos et al., 2008; Barcelos et al., 2011), aunque en el ensayo de L-Arabinosa de *Salmonella* ha sido uno de los flavonoides más mutagénicos (Jurado et al., 1991).

Nuestros resultados están en concordancia con los hallados para mamíferos y humanos. Además de no ser genotóxica, la *Quercitina* ha mostrado ser un potente inhibidor de los efectos genotóxicos del Peróxido de Hidrógeno en los ensayos de antigenotoxicidad, con unos porcentajes de inhibición del 50-20% para las concentraciones de 0.009×10^{-6} M y 0.072×10^{-6} M. Ciertos autores también han detectado actividad antigenotóxica frente al agente oxidante tert-butilo hidroperóxido (Ramos et al., 2008) y contra otros agentes oxidativos que dañan el ADN como la Aflatoxina B1, el metil metano sulfonato y la doxorubicina (Barcelos et al., 2011).

Los resultados de la tabla 3.16. para genotoxicidad y antigenotoxicidad del *Limoneno* muestran que no es genotóxico, con una frecuencia media de mutaciones totales/ala de 0.30. Sin embargo, otros resultados ensayando concentraciones más altas revelan actividad genotóxica del limoneno en el Test S.M.A.R.T. del ala de *Drosophila* (Fernández-Bedmar et al., 2011). El *Limoneno* puede producir estrés oxidativo y la generación de ROS, actuando como un pro-oxidante en la concentración más alta. Este hallazgo concuerda con los resultados en células eucariotas, que sugieren que el *Limoneno* puede actuar como un agente pro-oxidante depende de la dosis (Bakkali et al. 2008). Más bien nuestros resultados están de acuerdo con el resto de autores para diferentes ensayos. No es mutagénico en el test de Ames para las estirpes TA98, TA100, TA1535, TA1537 o TA1538 de *Salmonella typhimurium* ya sea en el presencia o ausencia de activación por la fracción S9 de hígado de rata (Watabe et al., 1980, 1981; Haworth et al., 1983). No induce intercambio de cromátidas hermanas ni aberraciones cromosómicas en células de ovario de hámster chino incluso a dosis tóxicas (Fahrig, 1982).



Tabla 3.16. Resultados de genotoxicidad y antigenotoxicidad del *Limoneno*, *Quercitina* y *Ác. Valerénico* frente al Peróxido de Hidrógeno.

Concentración Compuesto (M)	Núm. de Alas	Clones por ala (número de clones) diagnosis (1)			
		Clones simples pequeños (1-2 células) m = 2	Clones simples grandes (más de 2 células) m = 5	Clones gemelos m = 5	Clones totales m = 2
Controles					
H ₂ O	39	0.23 (9)	0.026 (1)	0.026 (1)	0.28 (11)
0.65 Et-OH	40	0.4 (16) i	0	0.025 (1) i	0.43 (17) i
0.12 H ₂ O ₂	40	0.5 (20) +	0	0.025 (1) i	0.53 (21) i
Quercitina					
0.009 x 10 ⁻³	40	0.25 (10) -	0.05 (2) i	0	0.3 (12) -
0.072 x 10 ⁻³	22	0.36 (8) -	0.045 (1) i	0	0.41 (9) i
Limoneno					
1.6 x 10 ⁻⁶	34	0.24 (8) -	0.029 (1) i	0.029 (1) i	0.29 (10) -
1.56 x 10 ⁻³	32	0.31 (10) -	0	0	0.31 (10) -
Ac. Valerénico					
0.028 x 10 ⁻⁶	40	0.48 (19) i	0	0	0.48 (19) i
0.22 x 10 ⁻⁶	40	0.35 (14) -	0.15 (6) +	0.025 (1) i	0.53 (21) i
TRATAMIENTO COMBINADO					
Quercitina					
0.009 x 10 ⁻⁶	18	0.17 (3) -	0.06 (1) i	0	0.22 (4) -
0.072 x 10 ⁻⁶	26	0.23 (6) -	0.19 (5) +	0	0.42 (11) -
Limoneno					
1.6 x 10 ⁻⁶	40	0.4 (16) -	0	0	0.4 (16) -
1.56 x 10 ⁻³	30	0.3 (9) -	0.033 (1) i	0.033 (1) i	0.37 (11) -
Ac. Valerénico					
0.028 x 10 ⁻⁶	40	0.48 (19) i	0.025 (1) i	0	0.5 (20) i
0.22 x 10 ⁻⁶	28	0.43 (12) i	0	0	0.43 (12) -
(1) Diagnóstico estadístico de acuerdo con Frei y Würzler (1.988): + (positivo), - (negativo) e i (inconclusivo). m: factor de multiplicación. Niveles de significación $\alpha = \beta = 0.05$, test de una cola sin corrección de Bonferroni.					



Hemos detectado además actividad antigenotóxica para el *Limoneno* en el ensayo S.M.A.R.T., aunque sus valores son algo más bajos que los de la *Quercitina* (27%). Estos resultados están de acuerdo con los existentes para antigenotoxicidad del Limoneno en otros sistemas: e.g. es un eficaz inhibidor de la activación metabólica de nitrosaminas, por lo que se propone como un agente quimiopreventivo contra tumorogénesis pulmonar inducida por estos carcinógenos (Morse y Toburen, 1996) y ha mostrado también efectos antigenotóxicos en el ensayo de reversión D7 de *S. cerevisiae*, en las estirpes TA100 y TA102 de *Samonella* y en la estirpe K12B de *E. coli* (Vuković-Gačić, et al., 2006). El *Limoneno* inhibiría la genotoxicidad del H₂O₂ en nuestros experimentos, comportándose como un agente reductor que protegería a las células del estrés oxidativo inducido por el H₂O₂ (Roberto et al. 2009; La Rotta - Hernández, 2007). Finalmente, podemos aportar un dato importante para aconsejar el estudio en profundidad del Limoneno como agente quimiopreventivo: los estudios de longevidad de Fernández-Bedmar et al. (2011), demuestran que este fenol a concentraciones de 0.0111 and 0.18 mM usado como suplemento en la dieta de *Drosophila*, alarga significativamente su extensión de la vida.

El **Ácido Valerénico**, no sólo no es mutagénico (induce una media de 0.505 clones totales /ala), sino que es capaz de inhibir mutaciones inducidas por el Peróxido de Hidrógeno en el sistema S.M.A.R.T. de *D. melanogaster*, aunque en menor medida que la *Quercitina* y el *Limoneno* (12% como media). Estos resultados son los primeros proporcionados respecto a genotoxicidad/antigenotoxicidad para esta molécula.

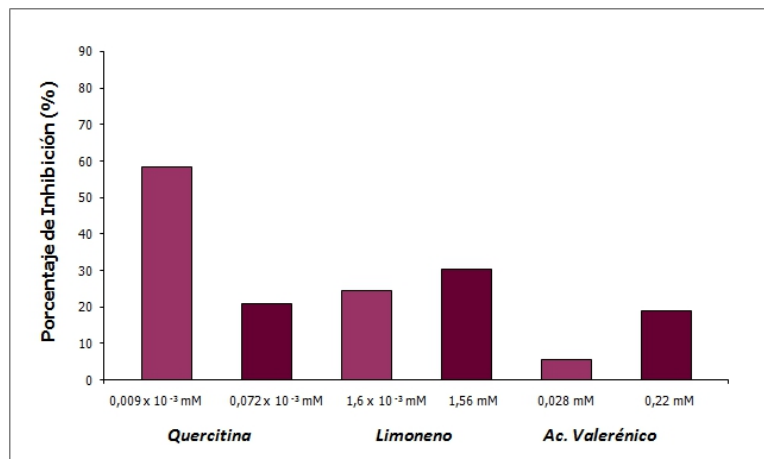


Fig. 3.15. Inhibición de los fenoles estudiados de las plantas sedantes



3.2. Modelo de Citotoxicidad

Los análisis de citotoxicidad se llevaron a cabo usando la prueba de exclusión de Azul Tripán en células humanas de leucemia HL-60. La actividad tumoricida de las diferentes plantas medicinales, tanto de la infusión como de la planta completa liofilizadas, así como de los fenoles más característicos de estas plantas, ha sido determinada mediante el seguimiento del crecimiento de los cultivos celulares durante 3 días sucesivos. Se obtuvieron las curvas dosis respuesta de supervivencia con datos a las 72 horas de tratamiento.

3.2.1. Análisis de los controles de Citotoxicidad

A continuación se presenta un ejemplo de crecimiento de esta línea celular usando *Brassica carinata* como modelo de sustancia citotóxica.

Primero determinamos el crecimiento celular de un cultivo frente a los tratamientos que pretendíamos ensayar. Para ello hicimos un seguimiento durante siete días, contabilizando las células viables y no viables cada 24 h desde el momento en que se aplicó el tratamiento (Tiempo 0). La figura 3.16. muestra un ejemplo de estos datos.

El incremento exponencial de células viables alcanza un pico máximo de los 2 millones de céls/ml a partir del cual las células empiezan a morir en igual proporción en que se dividían por envejecimiento del cultivo (excesiva concentración celular, agotamiento de nutrientes en el medio, cambio de pH, acumulación de desechos,...) (figura 3.16.A).

Se observa además un efecto dosis/respuesta de forma que al aumentar la concentración del compuesto aplicada, disminuye drásticamente la capacidad proliferativa/carcinogénica de estas células, es decir, se inhibe el crecimiento celular.

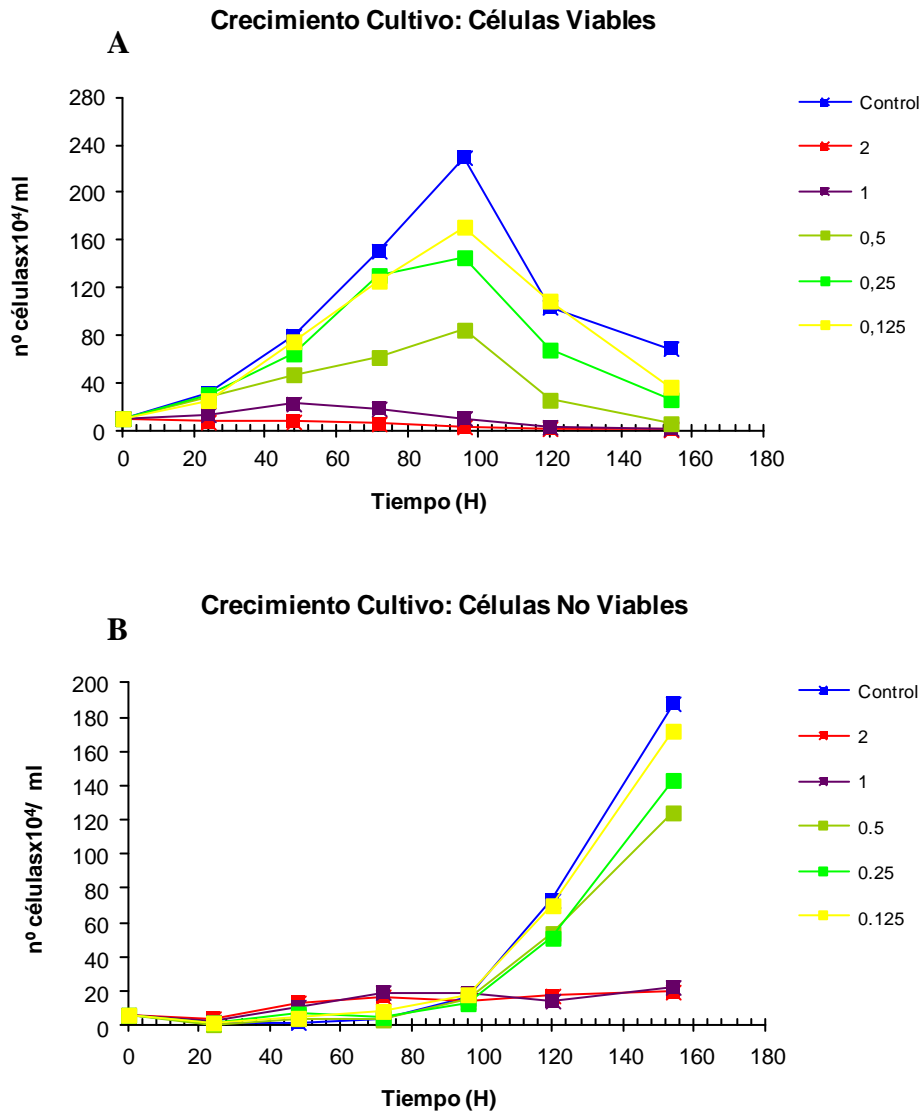


Figura 3.16. Recuento de células Viables y No Viables HL--60 durante el tratamiento.

En la figura 3.17. se puede observar la morfología que tendrían las células en función del tratamiento aplicado y de la hora de muestreo. Un cultivo en fase de crecimiento exponencial (figura 3.17.A) está caracterizado por una gran concentración de agrupaciones de células viables creciendo en suspensión que presentar un color amarillo brillante (figura 3.17.B-C). Por el contrario, si observamos el cultivo tratado a esa misma hora vemos como ha disminuido la concentración de éstas en el medio (figura 3.17.D) y además, prácticamente



todas las células son no viables (pierden su brillo y se tiñen de azul oscuro por el Azul Tripán) (figura 3.17.E-F).

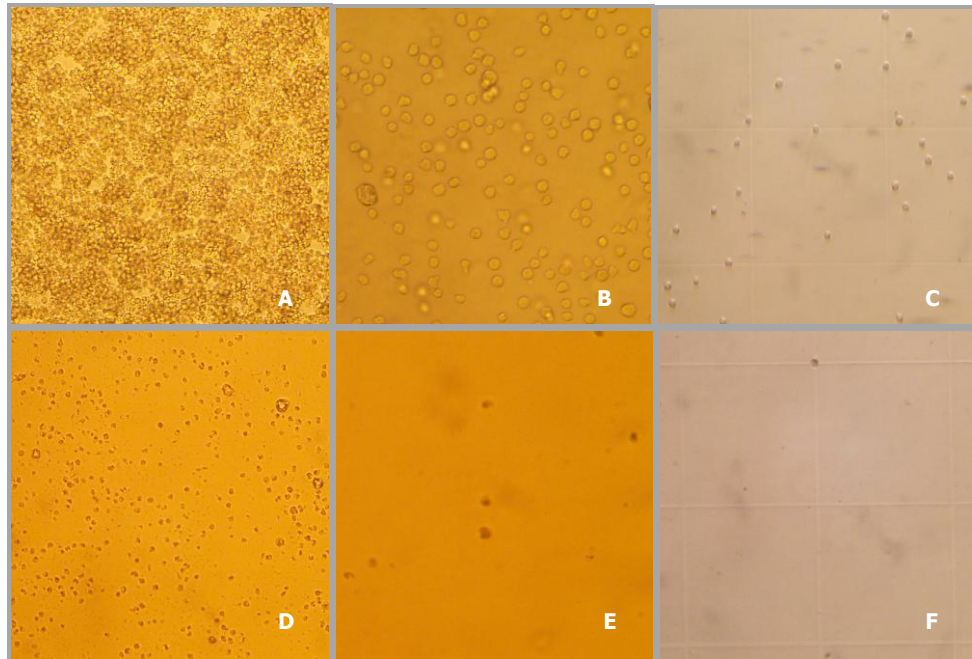


Figura. 3.17. Crecimiento Celular a las 72 h: Células Viables del Control creciendo en el pocillo (A), tras homogeneizar el medio (B) y tras la aplicación del Azul Tripán en la Cámara de Neubauer (C). Células No Viables del Tratamiento en el pocillo (D), tras la homogenización del medio (E) y tras la aplicación del Azul Tripán en la Cámara de Neubauer (F).

A las 120 h, el cultivo control mantiene una elevada concentración celular pero la situación se ha invertido: la mayoría son células no viables (figura 3.18.A-B Flechas Azules) quedando sólo algunas viables (figura 3.18.A-B Flechas Amarillas). A las 120 h, en el Tratamiento no aparecen células de ningún tipo (figura 3.18.C).

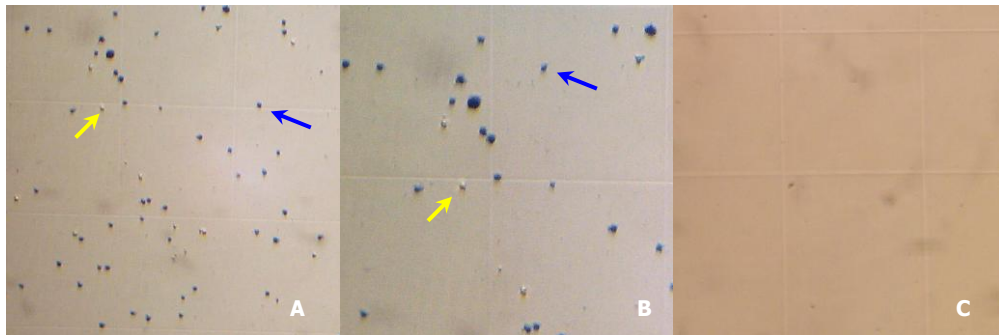


Figura. 3.18. Crecimiento Celular a las 120 h: Células Viables y No Viables del Control en el pocillo tras la aplicación del Azul Tripán en la Cámara de Neubauer (A-B). Tratamiento en el pocillo tras la aplicación del Azul Tripán en la Cámara de Neubauer (C).



Una vez se determinó que el crecimiento era el esperado en el rango de dosis seleccionadas, se hicieron al menos tres repeticiones de los distintos tratamientos para obtener los datos finales de crecimiento celular realizando los mismos recuentos ya explicados a las 72 h de tratamiento.

Los resultados se representaron gráficamente como la inhibición del crecimiento tumoral obtenida con los datos de la supervivencia corregidos para el control a las 72 horas del inicio del experimento de las diferentes concentraciones aplicadas de cada compuesto. Los datos se corresponden con la media de al menos tres experimentos independientes y está representado el error típico de cada uno de ellos.

3.2.2. Estudio de las Infusiones de las Plantas Medicinales seleccionadas

Las plantas medicinales representan la mayor fuente de principios activos utilizados para extraer nuevas moléculas utilizadas hoy día por las empresas farmacéuticas. Representan una *terra incognita* de aproximadamente 500.000 especies, el 90% del cual queda por explorar. Estas plantas son usadas por cerca de un 90% de los habitantes de algunos países en vía de desarrollo y forman la materia prima del 35% de los medicamentos prescritos hoy en los países industrializados, y más de la mitad de los tratamientos en venta libre. Pueden tener actividades anticarcinogénicas/carcinogénicas o tóxicas/citotóxicas según su composición química.

Las plantas medicinales tienen muchas propiedades saludables debidas a su composición compleja, que puede implicar la actuación no de varios componentes aislados, sino del conjunto de ellos sinérgicamente. Además de ensayar la inocuidad/seguridad de uso de las plantas seleccionadas y de sus efectos antígenotóxicos protectores del daño genético, hemos trabajado paralelamente con células promielocíticas HL-60 que se usan como modelo de análisis de inhibición del crecimiento tumoral mediante fitoquímicos, el cual se basa en la exclusión del Azul Tripán. De este modo se determinó la capacidad citotóxica de las diversas sustancias seleccionadas, tanto de la infusión de las plantas como de la planta completa liofilizada.

La línea celular HL-60 ha sido usada con anterioridad como modelo para detectar capacidades anticarcinogénicas de una amplia gama de compuestos (Akako et al, 2003). En



nuestro caso, hemos ensayado estas propiedades en las 6 plantas medicinales seleccionadas y en sus fenoles más característicos.

3.2.2.1. Plantas con actividad antiinflamatoria: *M. chamomilla-U. tomentosa*

Los resultados de crecimiento relativo respecto al control de las células HL-60 tratadas con las plantas medicinales con actividad antiinflamatoria, tanto en infusión como en planta completa, se presentan en las siguientes figuras (fig. 3.19.). Observamos que ambas plantas afectan al crecimiento tumoral de forma que lo inhiben, originando unas curvas típicas de citotoxicidad.

Podemos ver que *M. chamomilla* inhibe la proliferación de las células HL-60, siendo la dosis letal 50 en la planta completa aproximadamente 10 veces mayor que en la infusión, aunque los resultados previos a nuestro trabajo indican que sus extractos acuosos no son capaces de inhibir la proliferación de células de melanoma de Ratón (Trouillas et al., 2003; Millauskas et al., 2004). Por tanto, las presentaciones de la muestra, en infusión y planta completa, usadas por nosotros sí son eficaces frente a células cancerosas HL-60 y sugerimos que su contenido fenólico en *α -Bisabolol* y *Apigenina* entre otros podría ser la causa de su actividad citotóxica.

Los indios asháninka de la selva peruana usan extractos acuosos de la raíz o corteza del tallo de *U. tomentosa* para el tratamiento de la fiebre, abscesos, del cáncer, la artritis, contracepción, úlceras gástricas, hemorragias, desórdenes intestinales o menstruales y en general para todas las enfermedades que se presentan en zonas rurales, e incluso urbanas, donde no hay acceso fácil a un médico (Jones, 1995). Nuestros resultados para los tratamientos *in vitro* de células HL-60 con *U. tomentosa* (figura 3.19.), tanto la infusión como la planta completa, revelan una inhibición de la proliferación de estas células elevada y a una concentración semejante. Se conoce que *U. tomentosa* inhibe la proliferación de células cancerosas (Riva et al., 2001; Sheng et al., 2000 a) y sus extractos acuosos inducen apoptosis en células de leucemia (Sheng et al., 1998) y aceleran la recuperación de glóbulos blancos (Sheng et al., 2000 a). Concretamente, en células mononucleares de la sangre, los extractos de *U. tomentosa* inducen apoptosis y una disminución de la viabilidad de celular, con la excepción de extractos acuosos de hojas. Se han observado diferencias en la actividad biológica entre extractos acuosos y de etanol (mayor contenido fenólico), presentando éstos últimos efectos negativos más fuertes sobre las células mononucleares de sangre. Por lo que el



tipo de solvente de extracción utilizado tiene una influencia significativa en la composición química de los extractos que se prueben (Bors et al., 2012). Recientemente, se ha descubierto que extractos etanólicos de *U. tomentosa* no son inmunotóxicos en ratón y además son capaces de modular distintos patrones del sistema inmune de manera dosis-dependiente, como la inhibición de la proliferación de linfocitos T inducidos por mitógenos (Domingues et al., 2011).

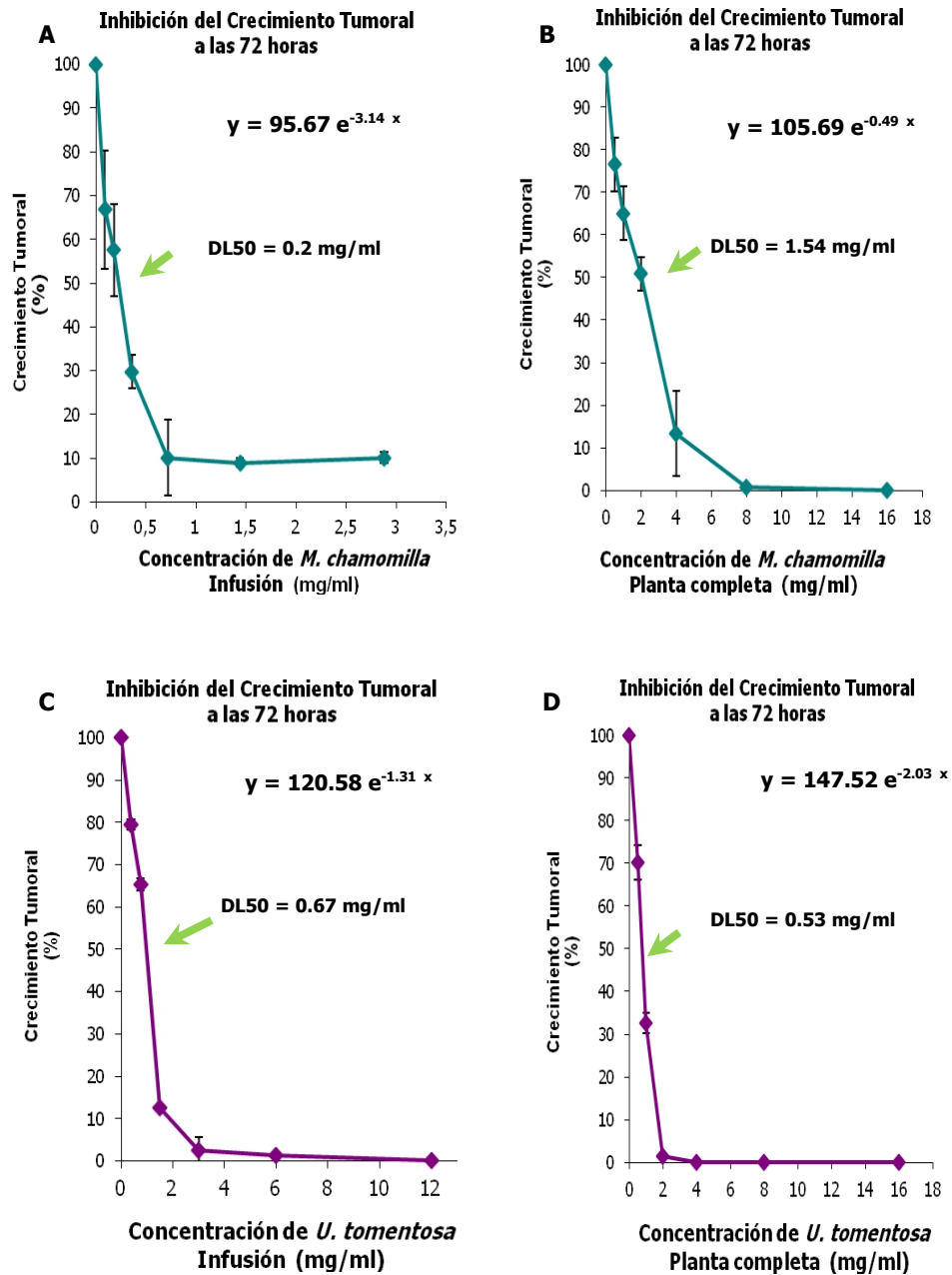


Fig. 3.19. Curvas de Inhibición del Crecimiento Tumoral a las 72 horas, con respecto al control, de plantas medicinales con actividad antiinflamatoria.

Nuestros resultados están en completo acuerdo con los de los autores consultados. Los alcaloides oxindólicos pentacíclicos contenidos en los extractos poseen actividad antileucémica



in vitro (Stupper et al., 1993), por lo que podrían ser, entre otras moléculas como los fenoles, los elementos bioactivos de la planta completa.

3.2.2.2. Plantas con actividad digestiva: *M. piperita*-*M. pulegium*

Para las plantas medicinales con propiedades digestivas, los resultados obtenidos de citotoxicidad aparecen en la figura 3.20. Observamos que la DL50 de la planta completa de *M. piperita* es el doble que en su infusión. Mientras que para *M. pulegium* ocurre lo contrario, la DL50 de la planta completa es la mitad que en la infusión.

El aceite esencial de *M. piperita* también es citotóxico para linfocitos humanos (Lazutka et al., 2001). Nosotros sugerimos tanto el *Mentol* como la *Pulegona* como los fenoles responsables en parte de la actividad citotóxica de las dos mentas estudiadas.

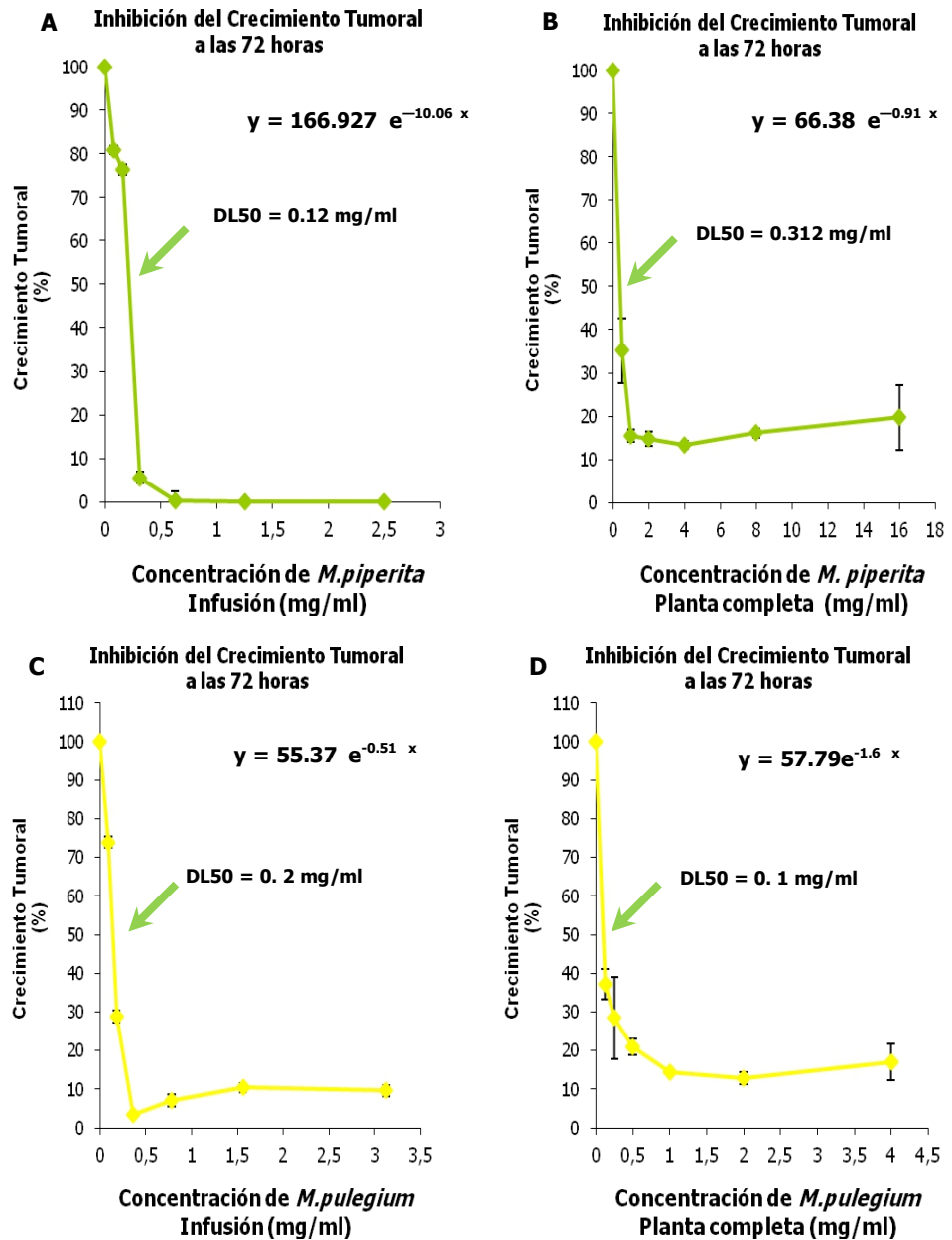


Fig. 3.20. Curvas de Inhibición del Crecimiento Tumoral a las 72 horas, con respecto al control, de plantas medicinales con actividad digestiva.



3.2.2.3. Plantas con actividad sedante: *T. cordata*-*V. officinalis*.

En los ensayos de citotoxicidad con *T. cordata* y *V. officinalis* (figura 3.21.), plantas consideradas sedantes, podemos observar que ocurre lo mismo que en el caso de las digestivas; *T. cordata* inhibe la proliferación celular en ambas presentaciones, pero la DL50 es el doble en la planta completa que en la infusión.

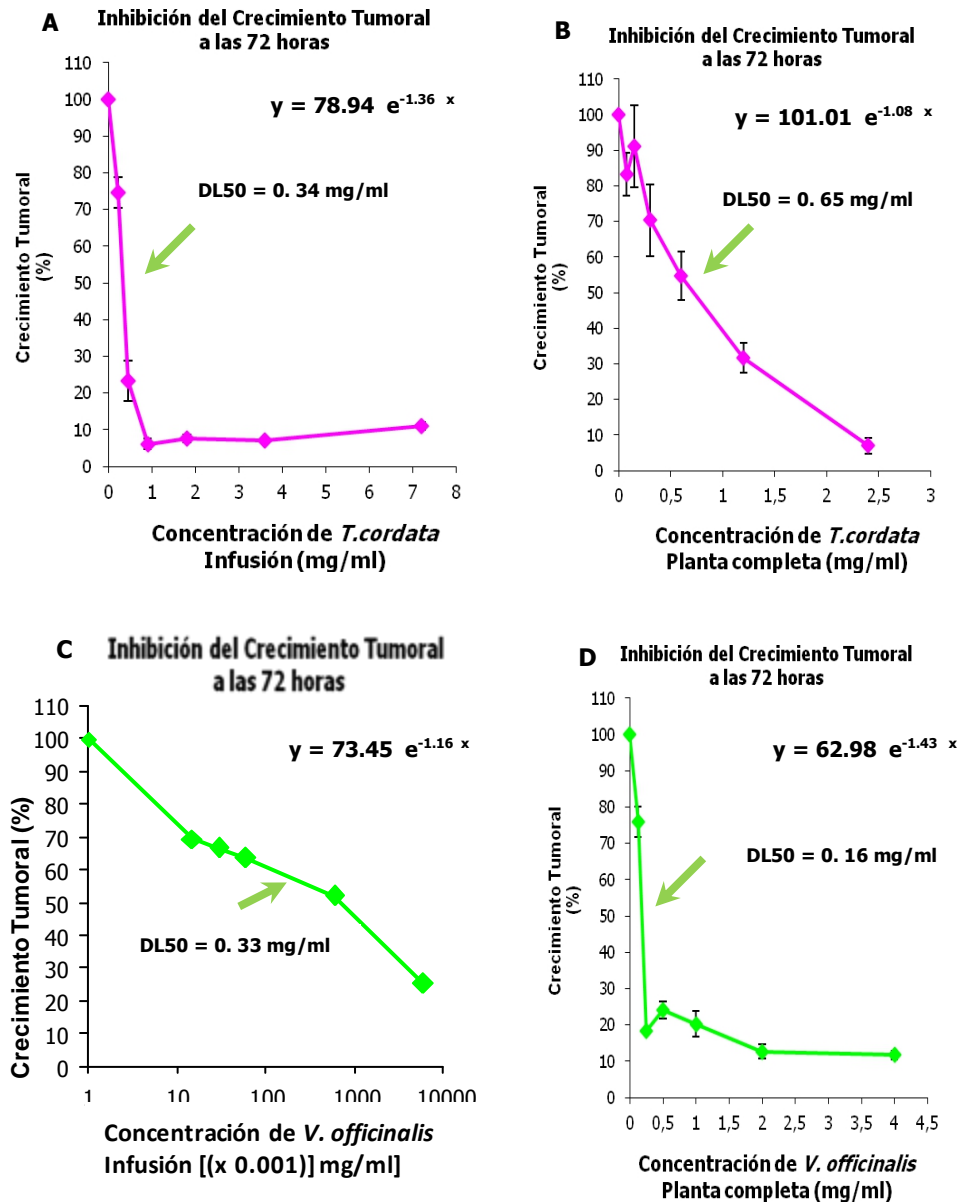


Fig. 3.21. Curvas de Inhibición del Crecimiento Tumoral a las 72 horas, con respecto al control, de plantas medicinales con actividad sedante.



Sabemos que extractos de *T. cordata* tienen elevada actividad citotóxica frente a células de leucemia de ratón (Goun et al., 2002).

Por el contrario, en *V. officinalis* vemos que la DL50 es el doble en la infusión que en la planta completa. Es importante señalar que *V. officinalis* no ha resultado tóxica en enfermos de cáncer tratados con esta planta para inducirles el sueño (Barton et al., 2011). Además, se comprobado que concentraciones no tóxicas de extractos acuosos de *V. officinalis* ejercen efectos citoprotectores de células de neuroblastoma humano cuando se tratan con sustancias que inducen apoptosis (De Oliveira et al., 2009). Los valepotriatos son citotóxicos e inhiben la síntesis de ADN (Bounthanth et al., 1981) y el dihidrovaltrato provoca una regresión del 54 % del tumor ascítico Krebs II (Anton et al., 1986). Por tanto, los valepotriatos, entre otros compuestos como el *Ácido Valerénico*, podrían ser los componentes bioactivos responsables de los efectos citotóxicos de la Valeriana.

3.2.3. Estudio de los Fenoles de las Plantas Medicinales seleccionadas

3.2.3.1. Fenoles de Plantas con actividad antiinflamatoria (*M. chamomilla-U. tomentosa*): *Bisabolol*-*Apigenina*-*DHBA*.

El *Bisabolol* es citotóxico en los ensayos con células HL-60 exhibiendo una DL50 de sólo 1.033 mM (figura 3.22.A). En trabajos anteriores se ha mostrado que este alcohol sesquiterpénico, mata rápidamente algunas líneas cancerosas humanas, incluido las del glioma induciendo fragmentación nucleosómica en las líneas de glioblastoma y astrocitoma humano U87 y T67 (Cavalieri et al., 2004). El efecto tumoricida de este fenol en la línea HL-60 puede ser debido a la inducción de la apoptosis, dado que se sabe exhibe una acción apoptótica en las células de glioma humano (Kerr y Harmon, 1991) y de rata (Piochon et al., 2009) y en células de leucemia HL-60 ensayadas por nosotros (Anter et al., 2011 c). En otros estudios se ha mostrado que *el Bisabolol* induce una liberación del citocromo c y la inducción de la apoptosis mediante el receptor Fas. La toxicidad del α -*Bisabolol* está claramente relacionada con su absorción celular, que es mayor en líneas celulares transformadas (Cavalieri et al., 2009). Al ser la acción de este fenol, selectiva pues su efecto en las células astrogiales normales no es citotóxico (Kerr y Harmon, 1991), se postula como un buen candidato para posteriores estudios de viabilidad como quimiopreventivo sin efectos adversos.

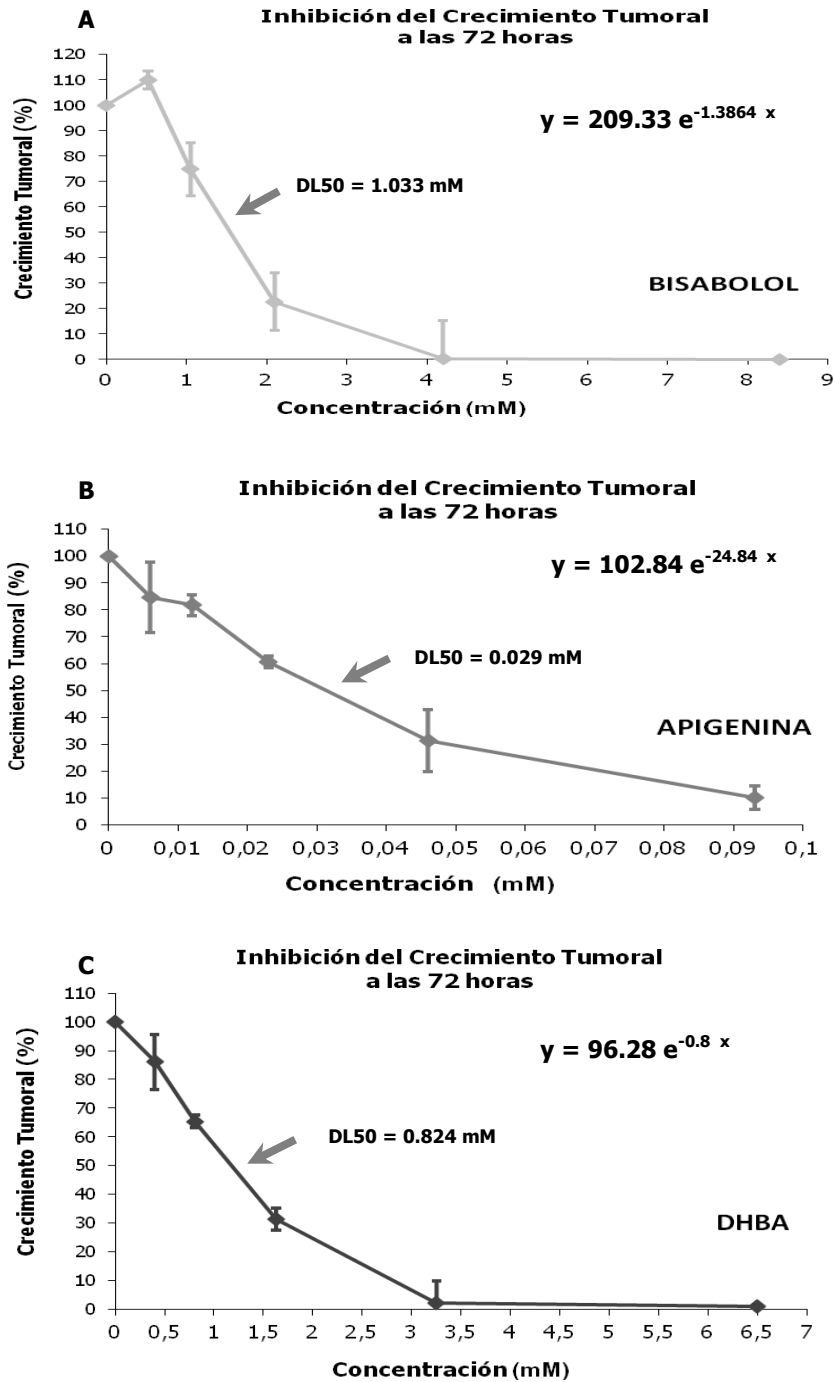


Fig. 3.22. Curva de Inhibición del Crecimiento Tumoral a las 72 horas, con respecto al control, de los fenoles de las plantas medicinales con actividad antiinflamatoria. **A:** Bisabolol; **B:** Apigenina; **C:** DHBA.



La Apigenina ha resultado citotóxica en los ensayos con células HL-60 exhibiendo una DL50 de sólo 0.029 mM (figura 3.22.B). Este alcaloide tiene múltiples efectos biológicos saludables y lo que es más importante, Cárdenas et al. (Cárdenas et al., 2006) han detectado una actividad citotóxica selectiva de *la Apigenina* sólo frente a células tumorales y no frente a células normales.

La *Apigenina* inhibe la promoción de tumores e induce apoptosis en las células cancerosas. Este fenol induce la apoptosis mediante la acción de la caspasa 3 con liberación del citocromo c (Wang et al., 1999) y la detención del ciclo celular en la fase G2/M en la línea celular mielóide HL-60 utilizada por nosotros y en fase Go/G1 para las células eritroides TF1, observándose en estas últimas inicio de la autofagia (Ruela-de-Sousa et al., 2010). Jayasooriya et al. (2012) encuentran que la *Apigenina* induce significativamente la citotoxicidad directa en células de leucemia humana (U937, THP-1 y HL-60) a través de la activación de la vía de la caspasas. Sin embargo, Arango et al. (2012) estudiaron que el tratamiento de las células de leucemia con *Apigenina* inducía daño en el ADN anterior a la activación de la apoptosis. El daño en el ADN inducido por la *Apigenina* fue mediado por p38 y por proteína quinasa C-delta, pero era independiente de la activación de la caspasa por especies reactivas de oxígeno, estableciendo que la *Apigenina* retrasa la progresión del ciclo celular en G1/S y aumenta el número de células apoptóticas. Además, análisis de todo el transcriptoma han mostrado que el daño de ADN inducido por la *Apigenina* induce la regulación de genes implicados en el control del ciclo celular y de la reparación del ADN. Los estudios de (Seo et al., 2012) encuentran que la *Apigenina* también induce apoptosis a través de la vía dependiente de P53.

Los estudios *in vivo* que confirman la actividad antileucémica de *la Apigenina* (Budhraj et al, 2012) apoyan nuestra conclusión de la búsqueda de nuevos ensayos clínicos para poder utilizar la *Apigenina* en quimioprevención.

EI DHBA es citotóxico para las células HL--60 a las concentraciones ensayadas por nosotros con una CI50 de 0.824 mM (figura 3.22.C). El *DHBA*: es bloqueante y supresor de tumores de diversa índole como se ha indicado en la Introducción del presente trabajo de Tesis y es apoptótico y antiproliferativo en células de cáncer de mama (Kampa et al, 2004). Pero este fenol puede inducir estrés oxidativo a altas concentraciones en las células de leucemia humana (Nakamura et al., 2000, b; Nakamura et al., 2001, b). Además, dependiendo de la cantidad de *DHBA* y el tiempo antes de la aplicación, este fenol puede reducir o aumentar el crecimiento de tumores inducidos químicamente (Nakamura et al., 2000, a). Asimismo, se describió que el AP aumenta la proliferación e inhibe la apoptosis de células



madre neuronales (Guan et al., 2009). Por tanto, aunque encontramos citotoxicidad elevada para el DHBA y hemos mostrado que esta muerte celular es vía apoptosis induciendo fragmentación internucleosomal en las células tratadas con DHBA a altas concentraciones (Anter et al., 2011 c), sugerimos realizar estudios en profundidad para aclarar definitivamente la posibilidad de su uso terapéutico.

3.2.3.2. Plantas con actividad digestiva (*M. piperita*-*M. pulegium*):

Mentol-Pulegona

En el presente trabajo hemos sugerido el *Mentol* y la *Pulegona* como las moléculas bioactivas responsables en gran parte de la actividad citotóxica de las mentas estudiadas. La figura 3.23. muestra las curvas de citotoxicidad frente a las células promielocíticas humanas HL-60. Ambos son citotóxicos, exhibiendo unas CI similares.

Nuestros resultados son los primeros en cuanto a citotoxicidad del *Mentol* en células HL-60. Existían claros indicios que apuntaban hacia nuestros resultados, ya que Berson y Pettersson (1983) ya sugirieron que deterioraba las membranas biológicas; concretamente, hoy se sabe que causa hemólisis y lesiones celulares (Mendanha et al., 2013) y que es citotóxico para células de cáncer de próstata PC-3 (Kim et al., 2012), células de cáncer gástrico SNU-5 (Lin et al., 2005), células de leucemia WEHI-3 (Lu et al., 2007), células de cáncer de colon Caco-2, células de leucemia MCF-7, CEM/ADR5000 y CCRF-CEM (Eid et al., 2012). Así mismo, hemos descrito a la *Pulegona* con efectos tumorocidas contra las células HL-60 por primera vez, estando estos resultados en concordancia con los de Mendanha et al., (2013) obtenidos en fibroblastos.

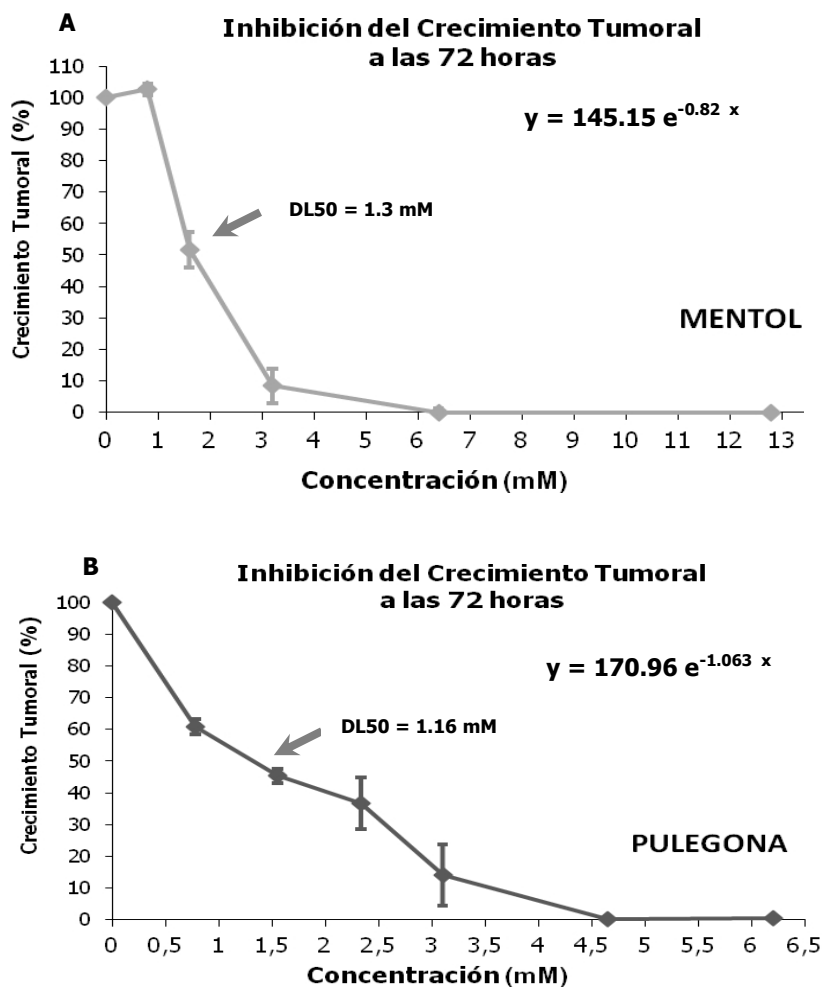


Fig. 3.23. Curva de Inhibición del Crecimiento Tumoral a las 72 horas, con respecto al control, de los fenoles de las plantas medicinales con actividad digestiva. **A:** *Mentol*; **B:** *Pulegona*.

3.2.3.3. Plantas con actividad sedante (*T. cordata-V. officinalis*):

Quercitina-Limoneno-Ac. Valerénico

Hemos incluido en este grupo de fenoles a la *Quercitina*, aunque podría estar en cualquier otro, ya que esta molécula se encuentra en la mayoría de plantas, frutas y bebidas. La *Quercitina* tiene una actividad biológica pleiotrópica, interviniendo en rutas de varias marcas de cáncer como son: apoptosis, autofagia, angiogénesis, activando la destrucción



inmune, desregulando las rutas energéticas celulares, inhibiendo la invasión y metástasis, en la inflamación y promoción de tumores, efectos antiproliferativos y supresores de crecimiento celular o en la senescencia (Russo et al., 2012). La *Quercitina* no ha resultado carcinogénica para ratas usada de manera crónica, (Hirono et al., 1981), aunque existen ciertos estudios que la señalan como carcinogénica a altas dosis (neoplasia en el epitelio tubular renal) y segura a dosis bajas en ratas F344/N (Harwood et al., 2007). Nuestros resultados están de acuerdo con las actividades saludables de este fenol señaladas arriba, obteniendo una CI50 de 0.04 mM.

El *Limoneno*, como ya se ha indicado, posee propiedades quimiopreventivas y quimioterapéuticas, previene la formación de tumores inducidos químicamente (Crowell y Gould, 1994) y manifiesta efectos antitumorales (Elegbede et al., 1986; Chander et al., 1994). Nosotros hemos encontrado un CI50 para el *Limoneno* de 1.2 mM, valor algo superior a los encontrados por Tatman y Mo (2002) (0.18mM) y Fernández Bedmar, et al., (2011) (0.2mM).

Ensayos *in vivo* con *Limoneno* arrojan resultados contradictorios, ya que inhibe la aparición de tumores hepáticos y gástricos en ratones inducidos químicamente (Parija y Das 2003; Lu et al. 2004) y de tumores químicamente inducidos y espontáneos en la glándula mamaria, piel, hígado, pulmón, esófago y páncreas de roedores (Chen et al., 1998) y actuar como un agente de pro-apoptótico con propiedades antitumorales prometedoras. Rabi y Bishayee (2009) demostraron el efecto apoptótico de limoneno en células de cáncer de próstata de DU-145 pero no en células epiteliales normales de la PZ - HPV - 7 de próstata. Fernández-Bedmar et al. (2011) demostraron la vía apoptótica del efecto citotóxico del *Limoneno* observando fragmentación internucleosomal en el ADN de células HL-60 tratadas con este fenol a las concentraciones de 0.6 1.2 y 2.3 mM. Sin embargo, en 1990, el Programa Nacional de Toxicología (NTP) indicó que aunque el *Limoneno* fue tumorigénico para el riñón de ratas macho, tales efectos no se observaron en las hembras o en otras especies. Posteriormente, se ha tenido la evidencia sustancial de que el mecanismo por el que el *Limoneno* está implicado en la tumorigénesis es específico de especie y sexo, ya que se da un tipo de nefropatía único a ratas macho. El desarrollo de esta nefropatía es debido a la interacción entre *Limoneno* y una globulina de bajo peso molecular que se encuentra sólo en ratas. Luego en humanos no podría ocurrir este fenómeno. Nosotros sugerimos, al igual que Lu et al. (2004) que el *Limoneno* puede ser de interés para estudiarlo como agente quimiopreventivo porque inhibe el crecimiento de tumores y metástasis a través de la apoptosis.

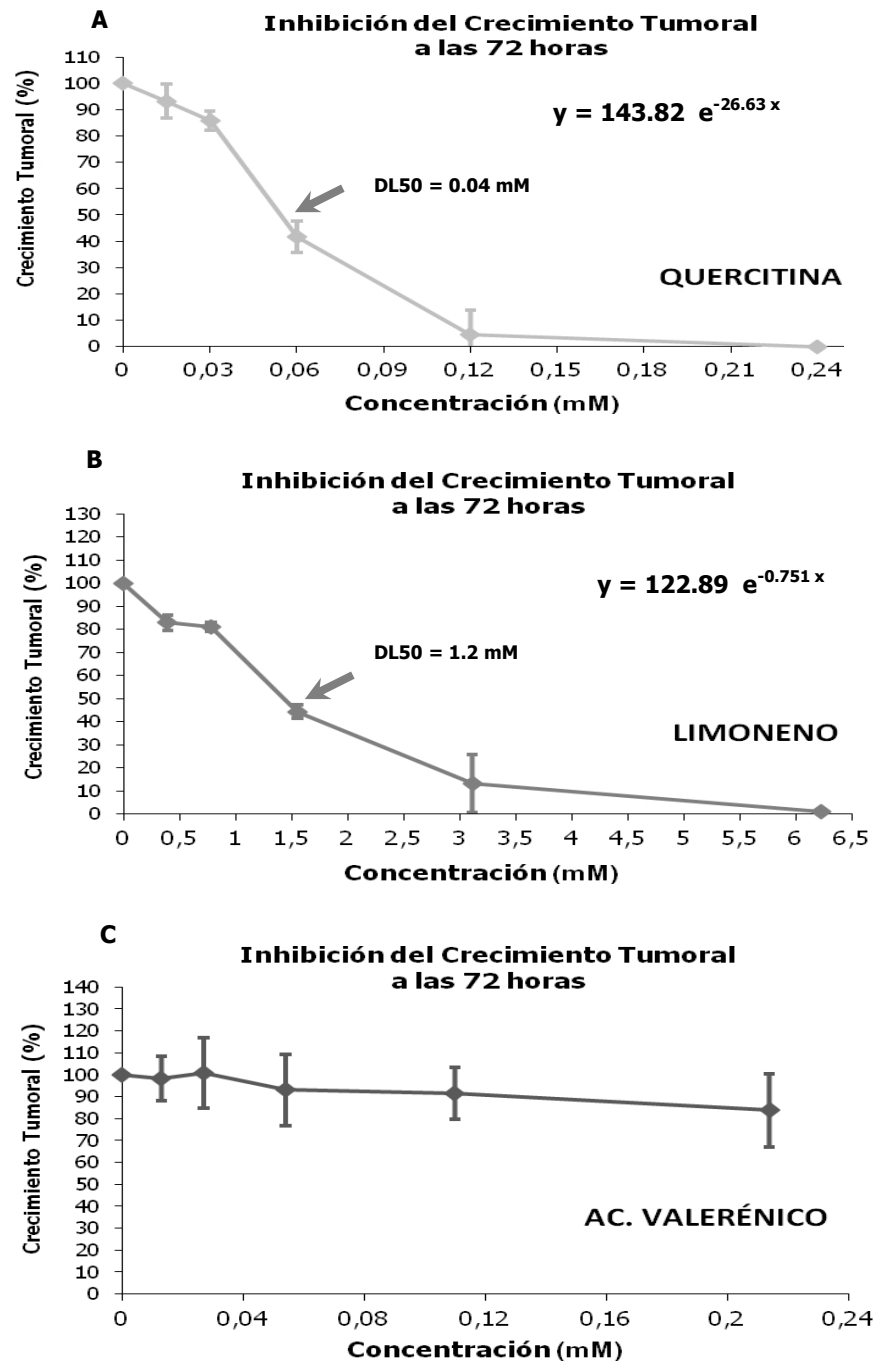


Fig. 3.24. Curva de Inhibición del Crecimiento Tumoral a las 72 horas, con respecto al control, de los fenoles de las plantas medicinales con actividad sedante. **A:** *Quercitina*; **B:** *Limoneno*; **C:** *Ac. Valerénico*,



Los ácidos valerénicos, exhiben citotoxicidad moderada con valores de IC50 entre 100 y 200 μM frente a células de cáncer de pulmón y de colon (Bos et al., 1998, a). Nuestros resultados de los ensayos de citotoxicidad para tratamientos de células promielocíticas HL-60 con el *Ácido Valerénico* están en total acuerdo con estos autores. Por tanto, podemos explicar la citotoxicidad encontrada en el presente trabajo para la Valeriana como el resultado conjunto de los ácidos valerénicos, los valepotriatos y los valtratos, así como del *d-Limoneno* y *Bisabolol* contenidos en ella. Los valepotriatos son citotóxicos e inhiben la síntesis de ADN (Bounthanh et al., 1981) y el dihidrovaltrato es capaz de provocar una regresión del 54 % del tumor ascítico Krebs II (Anton et al., 1986). Bounthanh et al., (1983) han observado la interferencia de los valepotriatos en la síntesis del ADN en varias líneas celulares en estudios con isótopos marcados. La potencial carcinogenicidad descrita para algunos valepotriatos se puede atribuir al grupo epóxido y al potencial alcalinizante de muchos de ellos (Houghton, 1999).

3.3. Estudio de la correlación de los resultados obtenidos

Los ciudadanos de los países del llamado primer mundo están cada día más concienciados de la idea hipocrática de que "*Que tu alimento sea tu medicina y tu medicina sea tu alimento*" y los países en vías de desarrollo también usan masivamente las plantas medicinales al no tener acceso a muchos otros medicamentos procedentes de la industria farmacéutica. Las plantas medicinales son hoy día una fuente de principios activos para el descubrimiento de nuevas moléculas. Sin embargo, el uso indiscriminado de plantas medicinales debe ser asesorado científicamente, ya que muchas pueden tener actividades anticarcinogénicas/carcinogénicas o tóxicas/citotóxicas según su composición química, cultivo, extracción o dosificación.

Es cada vez más evidente que las mutaciones y /o modificaciones epigenéticas en las células somáticas están implicadas no sólo en los procesos de carcinogénesis sino también en la patogénesis de enfermedades crónicas degenerativas, tales como aterosclerosis y enfermedades del corazón, que son las mayores causas de muerte en las poblaciones humanas. A pesar de la diversidad clínica de tales enfermedades, se sabe desde hace tiempo que están asociadas con factores de riesgo comunes así como con factores protectores comunes, y además comparten determinantes patogénicos comunes, tales como eventos genotóxicos o estrés oxidativo (De Flora, 1998). Concretamente, la prevención del cáncer de origen ambiental puede conseguirse bien evitando la exposición a mutágenos reconocidos o bien favoreciendo el consumo de factores protectores. Aunque esta última aproximación debe ser tomada con precaución, ya que se debe realizar un análisis riesgo-beneficio de los agentes



protectores, para lo cual existe una gran variedad de test *in vitro* e *in vivo* como se ha apuntado en la introducción de este trabajo. También se debe profundizar en el mecanismo de acción de los distintos agentes beneficiosos para la salud, ya que en ciertas ocasiones lo que se detecta no es un mecanismo específico sino un biomarcador general de protección frente a xenobióticos.

Está bien documentado que los factores de la dieta juegan un papel crucial en la etiología del cáncer humano, y todos los esfuerzos están dirigidos hacia la identificación de protectores (antimutagénicos y anticarcinogénicos) en las sustancias de los alimentos. Por el momento, la Dieta Mediterránea, basada en el consumo conjunto de frutas, verduras, legumbres y aceite de oliva, bien frescas o cocinadas, previene enfermedades degenerativas. Sin embargo, de esta dieta no podemos extraer un componente aislado como la causa originaria. La acción sinérgica de muchos de estos factores sería la causa de las propiedades saludables del consumo de esta variada nutrición tradicional. Los estudios genéticos y bioquímicos en modelos celulares o animales sobre los mecanismos de acción de los fitoquímicos nos proveen de la explicación funcional de cómo y por qué una dieta rica en vegetales es considerada saludable. No es usual encontrar moléculas que protejan contra enfermedades que difieren ampliamente desde un punto de vista fisiopatológico, como pueden ser el cáncer o enfermedades cardiovasculares. El estrés oxidativo ocasionado por especies reactivas de oxígeno, como el peróxido de hidrógeno que se forma endógenamente en las células, puede desencadenar la expresión de más de 100 genes (Allen y Tresini, 2000), y sus efectos pueden ser pleiotrópicos. No se sabe mucho los que desencadenan los fenoles, terpenos o alcaloides, ni las interacciones epigenéticas que pueden darse entre elementos altamente oxidantes (Peróxido de Hidrógeno) y elementos altamente antioxidantes (fenoles) actuando sinérgicamente. Nuestros estudios se han encaminado en este sentido, para dilucidar las consecuencias genéticas y celulares del papel antioxidante de los fenoles.

En las tablas siguientes (tabla 3.17., 3.18. y 3.19.) hemos intentado ensamblar nuestros resultados con los de otros autores, cuando existen. Hemos analizado cuatro tipos de indicadores diferentes (toxicidad, genotoxicidad, antigenotoxicidad y citotoxicidad) para las 14 sustancias seleccionadas (seis plantas y ocho fenoles).

Para poder comparar con otros resultados hemos establecido unos niveles para toxicidad de modo que una sustancia ha sido considerada tóxica a partir del 20%. De un total de 38 ensayos encontrados, incluyendo los nuestros, sólo existen discordancias con nosotros en 5 casos (87% de concordancia).



Dos estudios sobre *U. tomentosa* y uno sobre la *Apigenina*, en los que no se encuentra toxicidad y nosotros sí; un estudio sobre *V. officinalis* en el que se encuentra que induce hepatitis al ser ingerida en grandes cantidades y otro sobre *Quercitina* en el que se describe nefropatías y nosotros no encontramos toxicidad para *D. melanogaster*. Ni *T. cordata* (27% de toxicidad) ni *V. officinalis* (0% de toxicidad) habían sido antes testadas para toxicidad.

Tabla 3.17. Tabla corolario de las plantas **Antiinflamatorias**.

M. chamomilla	Toxicidad media	30 % * Aceite. Anisakis (Romero et al., 2012).
	Genotoxicidad media	0.6 no Genotoxicidad * Aceite SCE (Hernández-Ceruelos et al., 2002).
	Antigenotoxicidad media	70 %
	Inhibición del crecimiento tumoral	CI50: 0.2 y 1.54 mg/ml. * Extractos acuosos melanoma de ratón (Millauskas et al., 2004; Trouillas et al., 2003).
U. tomentosa	Toxicidad media	39 % * Eritrocitos (Bors et al., 2012). * Ratas y humanos (Keplinger et al., 1999). * CHO, bacterias (Santa Maria et al., 1997). * Inmunotóxicos (Domingues et al., 2011).
	Genotoxicidad media	0.73 no Genotoxicidad
	Antigenotoxicidad media	90 % * Ultravioleta-A en el test de Ames (Rizzi et al, 1993). * Reparación de ADN de cadena simple y doble (Sheng et al, 2000b). * Humo cigarro (Carretero, 2001).
	Inhibición del crecimiento tumoral	CI50: 0.67 y 0.53 mg/ml. * Extractos acuosos cél. mama (Riva et al., 2001; Sheng et al., 2000b). * Extractos acuosos cél. leucemia (Sheng et al., 1998). * Linfocitos T inducidos por mitógenos (Domingues et al., 2011).
Bisabolol	Toxicidad media	8 % * Glía de ratas (Cavallieri et al., 2004).
	Genotoxicidad media	0.22 no Genotoxicidad * <i>Salmonella</i> (Gomes-Carneiro et al., 2005).
	Antigenotoxicidad media	46.5% * <i>Salmonella</i> (Gomes-Carneiro et al., 2005).
	Inhibición del crecimiento tumoral	CI50: 1.033 mM * Células de leucemia HL-60 ensayadas por nosotros (Anter et al., 2011, c). * Líneas cancerosas humanas, incluido las del glioma líneas de glioblastoma y astrocitoma humano U87 y T67 (Cavaliere et al., 2004). * Apoptótico en las células de glioma humano (Kerr y Harmon, 1991). * Apoptótico en rata (Piochon et al., 2009).



Apigenina	Toxicidad media	32 % * Fibroblastos (Harborne y Williams, 2000). * Células normales mama y fibroblásticas (Cárdenas et al., 2006).
	Genotoxicidad media	0.235 no Genotoxicidad * Micronúcleos de ratón (Noel et al., 2006).
	Antigenotoxicidad media	43 % * <i>Salmonella</i> . (Miyazawa y Hisama, 2003; Birt et al, 1986; Hashemi et al, 2010). * Células CHO (Kuo et al., 1992). * Linfocitos humanos radioprotector (Rithidech et al., 2005).
	Inhibición del crecimiento tumoral	CI50: 0.029 mM. * Induce la apoptosis vía caspasas (Wang et al., 1999). * Detección del ciclo celular (Ruela-de-Sousa et al., 2010). * Células de leucemia humana (U937, THP-1 y HL-60) (Jayasooriya et al., 2012). * <i>in vivo</i> actividad anti-leucémica (Budhreja et al., 2012).
DHBA	Toxicidad media	15 % * Neuroprotector (Zhang et al., 2010; Guan et al., 2011). * Antidiabético ratones (Lin et al., 2011).
	Genotoxicidad media	0.39 no Genotoxicidad * Células CHO (Yen y Hsieh, 2000).
	Antigenotoxicidad media	38 %
	Inhibición del crecimiento tumoral	CI50: 0.824 mM. * Apoptótico y antiproliferativo en células de cáncer de mama (Kampa et al., 2004). * Dependiendo de la dosis y el tiempo puede reducir o aumentar el crecimiento de tumores inducidos (Nakamura et al., 2000, a). * Aumenta la proliferación e inhibe la apoptosis de células madre neuronales (Guan et al., 2009).
<p>En azul para estudios en concordancia con nuestros resultados. Y en rojo para estudios en discordancia con nuestros resultados.</p>		

De los 38 ensayos de genotoxicidad encontrados, existe discordancia en 12 de ellos (69% de concordancia). Uno para el aceite de *M. chamomilla* en SCE; para *Apigenina* en el test de micronúcleos; para *DHBA* en células CHO; para aceite esencial de *M. piperita*; para el *Mentol* en células CHO; para la *Pulegona* en *Salmonella*; uno para extractos con diclorometano de *Valeriana* y otro para la misma planta en el test de micronúcleos; uno para *Quercitina* a altas dosis en el S.M.A.R.T., y para el mismo fenol en *Salmonella*; uno para *Limoneno* a altas dosis en S.M.A.R.T. y para *Ácido Valerénico* en células CHO. Ni *U. tomentosa*, ni *T. cordata* ni *Ác. Valerénico* han sido testados anteriormente para genotoxicidad, probándose su inocuidad para daño genético en *D. melanogaster*.


Tabla 3.18. Tabla corolario de las plantas **Digestivas.**

M. piperita	Toxicidad media	74 % * Aceite. Modificaciones encefálicas (Thorup et al., 1983).
	Genotoxicidad media	-0.45 no Genotoxicidad * Extracto hidroalcohólico no teratogénico en fetos de ratones al ser usado comúnmente durante el período embrionario (Golalipour et al., 2011). * Aceite, induce débilmente SCE; y además el aceite es genotóxico en el test S.M.A.R.T. de <i>D. melanogaster</i> (Lazutka et al., 2001).
	Antigenotoxicidad media	66 % * Antimutagénica (Samarth y Kumar, 2011).
	Inhibición del crecimiento tumoral	CI50: 0.12 y 0.31 mg/ml. * Aceite, en linfocitos humanos (Lazutka et al., 2001). * Quimiopreventiva (Samarth et al., 2006). * Anticancerígena en hámster (Samman et al., 1998).
M. pulegium	Toxicidad media	40 % * Infusión hepatotóxica (Stickel et al., 2001).
	Genotoxicidad media	0.49 no Genotoxicidad * Aceite, en S.M.A.R.T. (Francios et al., 1997). * Aceite, en S.M.A.R.T. (Karpouhtsis et al., 1998).
	Antigenotoxicidad media	69 % * Aceite, en S.M.A.R.T. (Francios et al., 1997). * Aceite, en S.M.A.R.T. (Karpouhtsis et al., 1998). * Antigenotóxico SCE (Alpsoy et al., 2011).
	Inhibición del crecimiento tumoral	CI50: 0.2 y 0.1 mg/ml.

De los 34 ensayos de antigenotoxicidad examinados para las sustancias ensayadas, hemos encontrado una concordancia del 100%. Hemos de señalar que tanto *M. chamomilla*, como *DHBA*, *Mentol*, *Pulegona*, *T. cordata*, *V. officinalis* y *Ác. Valerénico* no habían sido testados para esta actividad biológica hasta ahora, mostrando todos ellos diversos niveles de actividad antigenotóxica, a excepción de la *Pulegona*.

Hemos expuesto 60 resultados de ensayos sobre inhibición del crecimiento tumoral o relacionados, diez de los cuales están en desacuerdo con los nuestros (83% de concordancia) encontrando que o bien no inhiben el crecimiento tumoral o bien lo inducen: dos ensayos con *M. chamomilla*, dos con *DHBA*, cuatro con la *Pulegona*, uno con la *Quercitina* y uno con el *Limoneno*, siendo estos dos fenoles tumorigénicos en el riñón de rata macho exclusivamente. Es la primera vez que se prueba la actividad citotóxica frente a una línea tumoral de *M. pulegium* y *V. officinalis*.



Mentol	Toxicidad media	25 % * Tóxico eritrocitos (Mendaghna et al., 2013). * Membranas celulares (Bernson y Pettersson, 1983).
	Genotoxicidad media	0.315 no Genotoxicidad * SCE linfocitos humanos (Murthy et al., 1991). * Células CHO (Kiffe et al., 2003).
	Antigenotoxicidad media	13 %
	Inhibición del crecimiento tumoral	CI50: 1.3 mM * Próstata PC-3 (Kim et al., 2012). * Gástrico SNU-5 (Lin et al., 2005). * Leucemia WEHI-3 (Lu et al., 2007). * Caco-2, MCF-7, CEM/ADR5000 y CCRF-CEM (Eidet et al., 2012).
Pulegona	Toxicidad media	29 % * En Hígado (Thorup, et al., 1983), cerebro (Anderson et al., 1996) y pulmones de roedor4es (Gordon et al., 1982).
	Genotoxicidad media	0.58 no Genotoxicidad * <i>S. typhimurum</i> TA97, TA98, TA100 y TA1535 y <i>E.coli</i> WP2 uvrA/pkM101 . (NTP). * Micronúcleos ratón macho y hembra B6C3F1 (NTP). * <i>S. typhimurium</i> TA98 y <i>E.coli</i> WP2 uvrA/pkM101 . (NTP).
	Antigenotoxicidad media	0 % * <i>Salmonella</i> (Miyazawa y Hisama, 2003; Birt et al, 1986; Hashemi et al, 2010). * Células CHO (Kuo et al., 1992). * Linfocitos humanos radioprotector (Rithidech et al., 2005).
	Inhibición del crecimiento tumoral	CI50: 1.16 mM. * Fibroblastos (Mendaghna et al., 2013). * Induce tumores en vejiga de ratas F344/N. (NTP). * Induce adenomas y hepatomas en ratas macho y hembra (NTP). * Induce osteomas y osteosarcomas en ratones B6C3F1 (NTP). * Induce lesiones neoplásicas en hígado, esófago y nariz de ratas y ratones (NTP).
<p>En azul para estudios en concordancia con nuestros resultados. Y en rojo para estudios en discordancia con nuestros resultados.</p>		

Salvo el caso llamativo de *Quercitina* y *Limoneno*, donde se constatan los problemas de traslación, entre mamíferos, e incluso entre sexos de la misma especie, las causas fundamentales de las discordancias halladas se pueden imputar a obtenciones de muestra diferentes (como el caso extremo de utilizar aceites esenciales en vez de extractos acuosos), dosis muy diferentes y por último a indicadores biológicos de toxicidad, genotoxicidad, antigenotoxicidad y citotoxicidad diferentes, como queda reflejado en la tabla 3.19.

En este trabajo hemos aportado un nuevo cuerpo de datos sobre su seguridad en el uso y el potencial protector y quimiopreventivo de sustancias simples y complejas de origen botánico. Teniendo en cuenta nuestros resultados y las concordancias con otros ensayos de



Tabla 3.19. Tabla corolario de las plantas Sedantes		
T. cordata	Toxicidad media	27 %
	Genotoxicidad media	0.57 no Genotoxicidad
	Antigenotoxicidad media	68 %
	Inhibición del crecimiento tumoral	CI50: 0.34 y 0.65 mg/ml. * Extractos. Células de Leucemia de ratón (Goun et al., 2002).
V. officinalis	Toxicidad media	3 % * No es tóxica en humanos (Tabach et al., 2009). * En enfermos de cáncer para inducir sueño (Barton et al., 2001). * Grandes cantidades de infusión, hepatitis aguda (Caldwell et al., 1994).
	Genotoxicidad media	0.55 no Genotoxicidad * No es mutagénica en el test de <i>Salmonella</i> . (De Déciga-Campos et al., 2007). * Extractos obtenidos con diclorometano, en líneas endoteliales humanas. Roturas en ADN (Hui-lian et al., 2003). * Micronúcleos de ratón (Al-Majed et al., 2006).
	Antigenotoxicidad media	70 %
	Inhibición del crecimiento tumoral	CI50: 0.33 y 0.16 mg/ml.
Quercitina	Toxicidad media	14 % * Nefritis en Humanos (Lamsson y Brignall, 2000). * Nefropatías en rata (Harwood et al., 2007; Ferry et al., 1996).
	Genotoxicidad media	0.36 no Genotoxicidad * No genotóxica en el test del cometa en céls. HepG2 (Ramos et al., 2008; Barcelos et al., 2011). * Genotóxica en S.M.A.R.T. a elevadas concentraciones 0.05 y 5 mM (Graf et al., 1994); y en L-Arabinosa de <i>Salmonella</i> ha sido uno de los flavonoides más mutagénicos (Jurado et al., 1991).
	Antigenotoxicidad media	40 % *Antigenotóxica frente a oxidantes (Ramos et al., 2008; Barcelos et al., 2011).
	Inhibición del crecimiento tumoral	CI50: 0.04 mM *Inhibe invasión metástasis, promoción de tumores, efectos antiproliferativos y supresores de crecimiento celular (Russo et al., 2012). * Antiangiogénica (Teicher et al., 1991). * Segura a dosis bajas en ratas F344/N (Harwood et al., 2007). * Carcinogénica en riñón de rata macho (Dunnick y Hailey, 1992).



Limoneno	Toxicidad media	13 % * Hemolisis en roedores, con lesiones celulares (Mendanha et al., 2013).
	Genotoxicidad media	0.3 no Genotoxicidad * No genotóxico en test Ames TA98, TA100, TA1535, TA1537 o TA1538 de <i>Salmonella</i> (Watabe et al., 1980, 1981; Haworth et al, 1983). * No genotóxica en SCE, en céls. CHO (Fahrig, 1982). * Genotóxico a dosis más altas en S.M.A.R.T. (Fernández-Bedmar et al., 2011).
	Antigenotoxicidad media	27 % * Inhibe la activación metabólica (Morse y Toburen, 1996). * Antigenotóxico en el ensayo de reversión D7 de <i>S. cerevisiae</i> , y en las estirpes TA100 y TA102 de <i>Salmonella</i> . * Antigenotóxico en <i>E. coli K12B</i> (Vuković-Gaćić, et al., 2006).
	Inhibición del crecimiento tumoral	CI50: 1.2 mM. * Quimiopreventivas (Crowell et al., 1992; homburger et al, 2971; Maltzman et al., 1989; Wattermberg y Coccia, 1991). * Quimioterapéuticas (Elegbede et al., 1986; Haag et al., 1992) * Tatman y Mo (2002): 0.18 mM y Fernández-Bedmar et al. (2011): 0.2 mM. * Gástricos y hepáticos (Parija y Das, 2003; Lu et al, 2004) * Tumores químicamente inducidos y espontáneos en la glándula mamaria, piel, hígado, pulmón, esófago y páncreas de roedores (Chen et al., 1998). * Agente pro-apoptótico con propiedades antitumorales prometedoras (Rabi y Bishayee, 2009). * Tumorigénico en riñón de ratas macho (NTP).
Ac. Valerénico	Toxicidad media	NO ES TÓXICO * Neuroprotector (Zhang et al., 2010; Guan et al., 2011). * Antidiabético ratones (Lin et al., 2011).
	Genotoxicidad media	0.505 no Genotoxicidad * Células CHO (Yen y Hsieh, 2000).
	Antigenotoxicidad media	12 %
	Inhibición del crecimiento tumoral	CI50: No se alcanza; CI80: 0.22 mM. MODERADA. * Citotoxicidad moderada con valores de IC50 entre 100 y 200 µM frente a células de cáncer de pulmón y de colon (Bos et al., 19998, a). MODERADA.
<p>En azul para estudios en concordancia con nuestros resultados. Y en rojo para estudios en discordancia con nuestros resultados.</p>		

genotoxicidad, antigenotoxicidad y citotoxicidad sugerimos: estudiar nuevos indicadores de bioactividad para proponer en un futuro a las sustancias de mejor comportamiento como nutraceuticos (*U. tomentosa*, *M. piperita*, *M. pulegium*, *T. cordata*, *Bisabolol* y *Mentol*); confirmar nuestros resultados de que *Quercitina* y *Limoneno* son quimiopreventivos y no tienen actividad carcinogénica realizando nuevos ensayos en modelos humanos; confirmar nuestros resultados para *Valeriana* y *Ác. Valerénico* mediante otros ensayos; y eliminar la *Pulegona* como posible sustancia saludable.

CONCLUSIONES





4. Conclusiones

En este trabajo hemos aportado un nuevo cuerpo de datos de sustancias simples y complejas de origen botánico sobre su seguridad en el uso (toxicidad, genotoxicidad) y sobre su potencial protector (antigenotoxicidad) y quimiopreventivo (inhibición del crecimiento tumoral). Para ello hemos utilizado un sistema *in vivo* de *D. melanogaster* y un sistema *in vitro* de línea celular leucémica humana.

1. Todas las plantas y moléculas ensayadas han resultado tóxicas para *D. melanogaster*, aunque a distintas intensidades, que son en orden creciente: *V. officinalis*, *Ác. Valerénico*, *Bisabolol*, *Limoneno*, *Quercitina*, *DHBA*, *Mentol*, *T. cordata*, *Pulegona*, *M. chamomilla*, *Apigenina*, *U. tomentosa*, *M. pulegium* y *M. piperita*. Destacamos, en general, las plantas sedantes Tila y Valeriana, así como sus componentes estudiados los menos tóxicos y las digestivas mentas las más tóxicas.

2. Ninguna planta ni molécula estudiada ha resultado genotóxica en el ensayo de Mutaciones y Recombinaciones Somáticas de *D. melanogaster*, por lo que todas son seguras. Aunque algunas sustancias muestran tasas de inducción de clones altas como *U. tomentosa* y *M. chamomilla*, las de otras están incluso por debajo del control negativo como el *Bisabolol* y la *Apigenina*.

3. Todas las plantas y moléculas, excepto la *Pulegona*, han mostrado actividad protectora del genoma frente a la inducción de mutaciones provocada por el Peróxido de Hidrógeno. Las más potentes son las infusiones de las plantas, ejerciendo las moléculas individuales inhibiciones medias o bajas. Este fenómeno sugiere la existencia de interacciones epigenéticas que pueden darse entre elementos endógenos altamente oxidantes (Peróxido de Hidrógeno) y elementos altamente antioxidantes (fenoles) actuando conjuntamente en la planta.

4. Todas las plantas y moléculas han sido capaces de inhibir el crecimiento de la línea celular promielocítica humana HL-60, aunque el *Ác. Valerénico* sólo alcanza a inhibir el 20%. Tila, Valeriana y *U. tomentosa* son las plantas menos potentes, siendo las más citotóxicas las Mentas y la Manzanilla. Los fenoles más eficaces frente a las células de leucemia son *Apigenina*, *Quercitina*, *DHBA* y *Bisabolol*.



5. Teniendo en cuenta nuestros resultados y las concordancias con otros ensayos de genotoxicidad, antigenotoxicidad y citotoxicidad proponemos seguir estudiando nuevos indicadores de bioactividad para proponer en un futuro a las sustancias de mejor comportamiento como nutraceuticos: *U. tomentosa*, *M. piperita*, *M. pulegium*, *T. cordata*, *Bisabolol* y *Mentol*. Así mismo, confirmar nuestros resultados que *Quercitina* y *Limoneno* no tienen actividad carcinogénica en humanos realizando nuevos ensayos y confirmar nuestros resultados para Valeriana y *Ác. Valerénico* mediante otros ensayos; eliminar la *Pulegona* como posible sustancia saludable.

BIBLIOGRAFÍA





5. Bibliografía

- Abraham, S. K. (1994). Antigenotoxicity of coffee in the *Drosophila* assay for somatic mutation and recombination. *Mutagenesis*. 9, pp: 383-386.
- Abraham, S. K.; Graf, U. (1996). Protection by coffee against somatic genotoxicity in *Drosophila*: role of bioactivation capacity. *Food Chem. Toxicol.* 34, pp: 1-14.
- Abril, N.; Luque-Romero, F. L.; Prieto-Alamo, M. J.; Margison, G. P.; Pueyo, C. (1995). Ogt alkyltransferase enhances dibromoalkane mutagenicity in scission repair-deficient *Escherichia coli* K-12. *Mol. Carcinogen.* 12, pp: 110-117.
- Ahmad, F.; Ashraf, S.A.; Ahmad, F.A.; Ansari, J.A.; Siddiquee, R.A. (2011). Nutraceutical Market and its Regulation. *Am. J. Food Tech.* 6 (5), pp: 342-347.
- Ahmed, Z. U.; Walker, G. W. R. (1975). The effects of urethane, sodium monohydrogen arsenate and selenocystine on crossing-over in *Drosophila melanogaster*. *Can. J. Genet. Cyto.* 17, pp: 55-66.
- Akako, Y.; Maruyama, H.; Matsumoto, K.; Ohguchi, K.; Nishizawa, K.; Sakamoto, T.; Araki, Y.; Mishima, S.; Nozawa, Y. (2003). Cell growth inhibitory effect of cinnamic acid derivatives from propolis on human tumor cell lines. *Biol. Phar Bull.* 26, pp: 1057-1059.
- Alberts, B.; Bray, D.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K.; Watson, J. D. (1986). Biología molecular de la célula. Ediciones Omega, S. A. Barcelona.
- Aldridge, W. N. (1996). Mechanisms and Concepts in Toxicology. *Taylor & Francis. London.*
- Alejandro-Durán, E.; Alonso-Moraga, A.; Pueyo, C. (1987). Implication of active oxygen species in the direct-acting mutagenicity of tea. *Mutat. Res.* 188, pp: 251-257.
- Allen, J.R.; Hsu, I.C.; Carstens, L.A. (1975). Dehydroretroecine-induced rhabdomyosarcomas in rats. *Cancer Res.* 35, pp: 997-1002.
- Allen, R. G.; Tresini, M. (2000). Oxidative stress and gene regulation. *Free Radical. Bio. Med.* 28(3), pp: 463-499.
- Al-Majed, A.A.; Al-Yahya, A.A.; Al-Bekairi, A.M.; Al-Shabanah, O.A.; Qureshi, S. (2006). Studies on the cytological and biochemical effects of valerian in somatic and germ cells of Swiss albino mice. *Food Chem. Toxicol.* 44 (11), pp: 1830-1837.
- Alonso-Moraga, A.; Bocanegra, A.; Torres, J. M.; López-Barea, J.; Pueyo, C. (1987). Glutathione status and sensitivity to GSH-reacting compounds of *Escherichia coli* strains deficient in glutathione metabolism and/or catalase activity. *Mol. Cell. Biochem.* 73, pp: 61-68.
- Alonso-Moraga, A.; Graf, U. (1989). Genotoxicity testing of antiparasitic nitrofurans in the *Drosophila* wing somatic mutation and recombination test. *Mutagenesis*, 4(2), pp: 105-110.



- Alonso-Moraga, A.; Rodríguez-Ariza, R.; Dorado, G.; Alejandro-Durán, E.; Barbancho, M.; Pueyo, C. (1988). Active oxygen species are implicated in the direct acting mutagenicity of tea and coffee. *Mutat. Res.* 203, pp: 201-247.
- Alpsoy, L.; Sahin, H.; Karaman, S. (2011). Anti-oxidative and Anti-genotoxic effects of methanolic extract of *Mentha pulegium* on human lymphocyte cultures. *Toxicol. Ind. Health.* 27, pp: 647-654.
- Alvarez-Gonzalez, I.; Uc-Artigas, E.; Moreno, L. M.; Madrigal-Bujaidar, E. (2006). Inhibitory effect of alpha-bisabolol on the genotoxic damage induced by daunorubicin in mouse. *Toxicol. Lett.* 164, pp: 268-268.
- Ames, B. N.; Durston, W. E.; Yamasaki, E.; Lee, F. D. (1973). Carcinogens are mutagens: A simple test system combining liver homogenates for activation and bacteria for detection. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 69, pp: 3128-3132.
- Anderson, I.B.; Mullen, W.H.; Meeker, J.E.; Khojasteh Bakht, S.C.; Oishi, S.; Nelson, S.D.; Blanc, P.D. (1996). Pennyroyal toxicity: measurement of toxic metabolite levels in two cases and review of the literature. *Ann. Intern. Med.* 124, pp: 726-734.
- Anter, J.; de Abreu-Abreu, N.; Fernández-Bedmar, Z.; Villatoro-Pulido, M.; Alonso-Moraga, A.; Muñoz-Serrano, A. (2011, a). Targets of Red Grapes: Oxidative Damage of DNA and Leukaemia Cells. *Nat. Prod. Commun.* 6 (1), pp: 59-64.
- Anter, J.; Fernández-Bedmar, Z.; Villatoro-Pulido, M.; Demyda-Peyras, S.; Moreno-Millan, M.; Alonso-Moraga, A.; Muñoz-Serrano, A.; Luque de Castro, M.D. (2011, b). A pilot study on the DNA-protective, cytotoxic, and apoptosis-inducing properties of olive-leaf extracts. *Mutat. Res./Genetic Toxicol. Env. Mut.* 723 (2), pp: 166-170.
- Anter, J.; Romero-Jiménez, M.; Fernández-Bedmar, Z.; Villatoro-Pulido, M.; Analla, M.; Alonso-Moraga, A.; Muñoz-Serrano, A. (2011, c). Antigenotoxicity, Cytotoxicity, and Apoptosis Induction by *Apigenin*, *Bisabolol*, and *Protocatechuic Acid*. *J. Med. Food* 14 (3), pp: 276-283.
- Anton, R.; Haag, M.; Kuballa, B. (1986). Biological and therapeutic activity. The elevation of substances derived from natural sources. In: *Advances in medical phytochemistry*, D. Barton et W.D. Ollis, eds., *Londres, John Libbey*. pp: 13-23.
- Aquino, R.; De Feo, V.; de Simone, F.; Pizza, C.; Cirino, G. (1991). Plant metabolites, new compounds and anti-inflammatory activity of *Uncaria tomentosa*. *J. Nat. Prod.* 54 (2), pp: 453-459.
- Aquino, R.; de Simone, F.; Pizza, C.; Conti, C.; Stein, M.L. (1989). Plant Metabolites, structure and in vitro antiviral activity of quinovic acid glycosides from *Uncaria tomentosa* y *Guettarda platypoda*. *J. Nat. Prod.* 52 (4), pp: 679-685.



- Arango, D.; Parihar, A.; Villamena, F.A.; Wang, L.; Freitas, M.A.; Grotewold, E.; Doseff, A.I. (2012). Apigenin induces DNA damage through the PKC α -dependent activation of ATM and H2AX causing down-regulation of genes involved in cell cycle control and DNA repair. *Biochem. Pharmacol.* 80 (12), pp: 1571-1580.
- Ashburner, M. (1989). *Drosophila. A laboratory handbook*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York.
- Augiseau, L.; Barbin, Y.; Verbist, J.F. (1987). Une intoxication par une infusion de menthe. *Plantes Méd. Phytothér.* 21, pp: 149-152.
- Baars, A. J. (1980). Biotransformation of xenobiotics in *Drosophila melanogaster* and its relevance for mutagenicity testing. *Drug Metab. Rev.* 11 (2), pp: 191-221.
- Babich, H.; Sedletcaia, A.; Kenigsberg, B. (2002). In vitro cytotoxicity of *protocatechuic acid* to cultured human cells from oral tissue: Involvement in oxidative stress. *Pharmacol. Toxicol.* 91, pp: 245-253.
- Bakkali, F.; Averbeck, S.; Averbeck, D.; Idaomar, M. (2008). Biological effects of essential oils—A review. *Food Chem. Toxicol.* 46, pp: 446–75.
- Balls, M. (2004). Progressing toward the reduction, refinement and replacement of laboratory animal procedures: thoughts on some encounters with Dr Iain Purchase. *Toxicol. in Vitro.* 18, pp: 165-170.
- Barbacid, M. (1986). Mutagens, oncogenes and cancer. *Trends Genet.* 2, pp: 188-192.
- Barcelos, G.R.M.; Grotto, D.; Angeli, J.P.F.; Serpeloni, J.M.; Rocha, B.A.; Bastos, J.K.; Barbosa, F. (2001). Evaluation of Antigenotoxic Effects of Plant Flavonoids Quercetin and Rutin on HepG2 Cells. *Phytotherapy Res.* 25 (9), pp: 1381-1388.
- Barton, D.L.; Atherton, P.J.; Bauer, B.A. Moore, D.F.; Mattar, B.I.; LaVasseur, B.I.; Rowland, K.M.; Zon, R.; LeLindqwister, N.A.; Nagargoje, G.G.; Morgenthaler, T.I.; Sloan, J.A.; Loprinzi, C.L. (2011). The Use of *Valeriana officinalis* (Valerian) in Improving Sleep in Patients Who Are Undergoing Treatment for Cancer: A Phase III Randomized, Placebo-Controlled, Double-Blind Study (NCCTG Trial, N01C5). *J. Supp. Oncol.* 9 (1), pp: 24-31.
- Bast, A.; Chandler, R. F.; Choy, P. C.; Delmulle, L. M.; Gruenwald, J.; Halkes, S.B.A.; Keller, K.; Koeman, J.H.; Peters, P.; Przyrembel, H.; de Ree, E. M.; Renwick, A. G.; Vermeer, I. T.M. (2002). Botanical health products, positioning and requirements for effective and safe use. *Env. Toxicol. Pharm.* 12, pp: 195-211.
- Becker, J.; Mezge, V.; Courgeon, A. M.; Best-Belpomme, M. (1991). On the mechanism of action of H₂O₂ in the cellular stress. *Free Radic. Res. Commun.* 12-13, pp: 455-460.
- Bernson, V.S.M.; Pettersson, B. (1983). The toxicity of menthol in short-term bioassays. *Chemico-Biol. Interact.* 46 (2), pp: 233-246.



- Birt, D. F.; Walker, B.; Tibbels, M. G.; Bresnick, E. (1986). Anti-mutagenesis and anti-promotion by *apigenin*, *robinetin* and *indole-3-carbinol*. *Carcinogen*. 7, pp: 959-963.
- Block, G. (1992). The data support a role for antioxidants in reducing cancer risk. *Nutr. Rev.* 50, pp: 207-213.
- Blumenthal, M.; Goldberg, A.; Brinckmann, J. (2000). Herbal Medicine, Expanded Commission E Monographs. *Int. Med. Comm., Newton*. 1^a Ed. Pp: 297-3003.
- Bohlmann, F.; Zdero, C. (1982). Sesquiterpene lactones and other constituents from *Tanacetum parthemium*. *Phytochemistry*. 21, pp: 2543-2549.
- Bors, M.; Baczyn´ska, J.; Bukowska, B.; Duda, D.; Michalowicz, J.; Pilarski, R.; Gulewicz, K. (2009). The protective role of extracts from leaves and bark of *Uncaria tomentosa* (Willd.) DC in oxidative damage of human erythrocytes provoked by 2,4-D herbicide. In: Garbacz, J.K. (Ed.), *Diagnosing of State of the Environment, Research Methods-Prognosis*, vol. 3. Bydgoszcz, Poland, pp: 231-240.
- Bors, M.; Bukowska, B.; Pilarski, R.; Gulewicz, K.; Oszmiański, J.; Michalowicz, J.; Koter-Michalak, M. (2011). *Uncaria tomentosa* extracts protects human erythrocytes against oxidative stress induced by 2,4-dichlorophenol and catechol. *Food Chem. Toxicol.* 49, pp: 2202-2211.
- Bors, M.; Sicińska, P.; Michalowicz, J.; Wieteska, P.; Gulewicz, K.; Bukowska, B. (2012). Evaluation of the effect of *Uncaria tomentosa* extracts on the size and shape of human erythrocytes (*in vitro*). *Env. Toxicol. Pharm.* 33, pp: 127-134.
- Bos, R.; Hendriks, H.; Scheffer, J.J.C.; Woerdenbag, H.J. (1998, a). Cytotoxic potential of valerian constituents and valerian tinctures. *Phytomedicine*. 5 (3), pp: 219-225.
- Bos R.; Woerdenbag, H.J.; Pras, N. (2002). Determination of valepotriates. *J. Chromatography A*. 967, pp: 131-146.
- Bos, R.; Woerdenbag, H.J.; van Putten, F.M.; Hendriks, H.; Scheffer, J.J. (1998, b). Seasonal variation of the essential oil, *valerenic acid* and derivatives, and velopotriates in *Valeriana officinalis* roots and rhizomes, and the selection of plants suitable for phytomedicines. *Planta Med.* 64 (2), pp: 143-7.
- Bounthan, C.; Bergmann, C.; Beck, J.P.; Haag-Berrurier, M.; Anton, R. (1981). Valepotriates, a new class of cytotoxic and antitumor agents. *Planta Med.* 41, pp: 21-28.
- Bounthan, C.; Richert, L.; Beck, J.P.; Haag-Berrurier, M.; Anton, R. (1983). The action of valepotriates on the synthesis of DNA and proteins of cultured hepatoma cells. *Planta Med.* 49, pp: 138-142.
- Bravo, L. (1998). Poly phenols: chemistry, dietary sources, metabolism and nutritional significance. *Nutr. Rev.* 56, pp: 317-333.



- Breitman, T.R.; Selonick, S.E.; Collins, S.J. (1980). Induction of differentiation of the human promyelocytic leukemia cell line (HL60) by retinoic acid. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 77, pp: 2936-2940.
- Bruneton, J. (1996). *Plantas Tóxicas. Végetaux dangereux pour l'Homme et les animaux.* Lavoisier. *Tec.&Doc.* Paris.
- Budhraj, A.; Gao, N.; Zhang, Z.; Son, Y.O.; Cheng, S.; Wang, X.; Ding, S.; Hitron, A.; Chen, G.; Luo, J.; Shi, X. (2012). Apigenin induces apoptosis in human leukemia cells and exhibits anti-leukemic activity in vivo. *Mol. Cancer Ther.* 11 (1), pp: 132-42.
- Burcham, P. C. (1999). Internal hazards: baseline AND damage by endogenous products of normal metabolism. *Mutat. Res.* 443, pp: 11-36.
- Caldwell, S.H.; Feeley, J.W.; Wieboldt, T.F.; Featherston, P.L.; Dickson, R.C. (1994). Acute hepatitis with use of over-the-counter herbal remedies. *Virginia Medical Quarterly.* 121 (1), pp: 31-33.
- Campos Sánchez, J. (1999). Comunicación personal, no publicado. Universidad de Córdoba.
- Campos Sánchez, J. (2003). Evaluación Genotóxica del aceite de oliva y de los subproductos derivados de su elaboración. Tesis doctoral. Universidad de Córdoba, Dpto. de Genética.
- Cárdenas, M.; Marder, M.; Blank, V. C.; Roguin, L. P. (2006). Antitumor activity of some natural flavonoids and synthetic derivatives on various human and murine cancer cell lines. *Bioorg. & Med. Chem.* 14, pp: 2966-2971.
- Carretero, E. (2000). Terpenos: aceites esencial. *Panorama Actual Med.* 42 (238), pp: 1002-1006.
- Carretero, E. (2001). Alcaloides: derivados del triptófano y otros alcaloides (III). *Panorama Actual Med.* 25 (243), pp: 442-449.
- Cavaliere, E.; Bergamini, C.; Mariotto, S.; Leoni, S.; Perbellini, L.; Darra, E.; Suzuki, H.; Fato, R.; Lenaz, G. (2009). Involvement of mitochondrial permeability transition pore opening in alpha-bisabolol induced apoptosis. *FEBS J.* 275 (15), pp: 3990-4000.
- Cavaliere, E.; Mariotto, S.; Fabrizi, C.; de Patri, A.C.; Gottardo, R.; Leone, S.; Berra, L.V.; Lauro, G.M.; Ciampa, A.R.; Suzuki, H. (2004). Alpha-Bisabolol, a nontoxic natural compound, strongly induces apoptosis in glioma cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 315 (3), pp: 589-594.
- C.E.E. (1984). Directiva 84/449/CEE de la Comisión de 25 de abril de 1984 por la que se adopta, por sexta vez, al progreso técnico la Directiva 67/548/CEE del consejo relativa a la aproximación de las disposiciones legales, reglamentarias y administrativas en materia de



- clasificación, envasado y etiquetado de sustancias peligrosas, D.O.C.E. del 19 de septiembre de 1984.
- C.E.E. (1988). Directiva 87/302/CEE de la Comisión de 18 de noviembre de 1987 por la que se adopta, por novena vez, al progreso técnico la Directiva 67/548/CEE del consejo relativa a la aproximación de las disposiciones legales, reglamentarias y administrativas en materia de clasificación, envasado y etiquetado de sustancias peligrosas. D.O.C.E. del 30 de mayo del 1988.
- C.E.E. (1991 a). Directiva 91/325/CEE de la Comisión de 1 de marzo de 1991 por la que se adopta, por duodécima vez, al progreso técnico la Directiva 67/548/CEE del consejo relativa a la aproximación de las disposiciones legales, reglamentarias y administrativas en materia de clasificación, envasado y etiquetado de sustancias peligrosas. D.O.C.E. del 8 de julio de 1991.
- C.E.E. (2001). Directiva 2001/59/CE de la Comisión, de 6 de agosto de 2001, por la que se adapta, por vigésima octava vez, al progreso técnico la Directiva 67/548/CEE del Consejo relativa a la aproximación de las disposiciones legales, reglamentarias y administrativas en materia de clasificación, embalaje y etiquetado de las sustancias peligrosas D.O.C.E. 21 de agosto de 2001.
- Cerda, S.; Weitzman, S. A. (1997). Influence of oxygen radical injury on DNA methylation. *Mutat. Res.* 386, pp: 141-152.
- Cerri, R.; Aquino, R.; de Simone, F.; Pizza, C. (1988). New quinovic acid glycosides from *Uncaria tomentosa*. *J. Nat. Prod.* 51, pp: 257-261.
- Chan, P.C.; Mahler, J.; Bucher, J.R.; Travlos, G.S.; Reid, J.B. (1994). Toxicity and carcinogenicity of riddelliine following 13 weeks of treatment to rats and mice. *Toxicol.* 32, pp: 891-908.
- Chander, S.K.; Landsdown, A.G.B.; Luqmani, Y.A.; Gomm, J.J; Coope, R.C. (1994). Effectiveness of combined limonene and 4-hydroxyandrostenedione in the treatment of NMU-induced rat mammary tumours. *Br. J. Cancer.* 69, pp: 879-882.
- Chen, H.; Chan, K.K.; Budd, T. (1998). Pharmacokinetics of D-limonene in the rat by GC/MS assay. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 17, pp: 631-640.
- Clark, A.M. (1959). Mutagenic activity of the alkaloid heliotrine in *Drosophila*. *Nature (London)*. 183, pp: 731-732.
- Collins, S.J. (1987). The HL-60 promyelocytic leukemia cell line proliferation, differentiation and cellular oncogene expression. *Blood.* 70, pp: 1233-1244.



- Collins, S.J.; Gallo, P.C.; Gallagher, R.E. (1977). Continuous growth and differentiation of human promyelotic leukemia cell line (hl60) in suspension culture. *Nature*. 270, pp: 347-349.
- Collins, S.J.; Ruscetti, F.W.; Gallagher, R.E.; Gallo, R.C. (1978). Terminal differentiation of human promyelocytic leukemia cells induced by dimethyl sulfoxide and other polar compounds. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 75, pp: 2458-2462.
- Conte-Anazetti, M.; Silva-Melo, P.; Duran, N., Haun, M. (2003). Comparative cytotoxicity of dimethylamide- crotonin in the promyelocytic leukemia cell line (hl60) and human peripheral blood mononuclear cells. *Toxicol.* 188 (2-3), pp: 261-274.
- Cooney, R.V.; Nemhauser, J.; Morin, R.J. (1979). Inhibition of human lecithin cholesterol acyltransferase by monoterpenes. *Lipids*. 19, pp: 371-373.
- Cos, P.; Ying, L.; Calomme, M.; Hu, J.P.; Cimanga, K.; Van Poel, B.; Pieters, L. (1998). Structure-activity relationship and classification of flavonoids as inhibitors of xanthine oxidase and superoxide scavengers. *J. Nat. Prod.* 61, pp: 71-76.
- Cosyns, J.P. (2003). Aristolichic acid and "Chinese Herbs Nephropathy": a review of the evidence to date. *Drug Safety*. 26 (1), pp: 33-48.
- Courgeon A. M.; Maingourd, M.; Maisonhaute, C.; Montmory, C.; Rollet, E.; Tanguay, R. M.; Best-Belpomme, M. (1993). Effect of hydrogen peroxide on cytoskeletal proteins of *Drosophila* cells: comparison with heat shock and other stresses. *Exp. Cell. Res.* 204, pp: 30-37.
- Croom, E. (2012). Chapter Three-Metabolism of Xenobiotics of Human Environments. *Toxicol. Hum. Environm.* 112, pp: 31-38.
- Crowell, P.L.; Gould, M.N. (1994). Chemoprevention and therapy of cancer by d-limonene. *Crit. Rev. Oncol.* 5:1-22.
- Crowell, P.L.; Kennan, W.S.; Haag, J.D.; Ahman, S.; Vegejs, E.; Gould, M.N. (1992). Chemioprevention of mammary carcinogenesis by hydroxylated derivatives of d-limonene. *Carcinogenesis*. 13: 1261-1264.
- Déciga-Campos, M.; Rivero-Cruz, I.; Arriaga-Alba, M.; Castañeda-Corral, G.; Angeles-López, G.E.; Navarrete, A.; Mata, R. (2007). Acute toxicity and mutagenic activity of Mexican plants used in traditional medicine. *J. Ethnopharmacol.* 110 (2), pp: 334-342.
- De Almeida, A.A.C.; Pereira-Costa, J.; De Carvalho, R.B.F.; De Sousa, D.P.; De Freitas, R.M. (2012). Evaluation of acute toxicity of a natural compound (+)-limonene epoxide and its anxiolytic-like action. *Brain Research*. 1448 (11), pp: 56-62.



- De Felice, S.L. (1996). The need for a research-intensive nutraceutical industry: what can congress do? (the claims research connection). In S. Shaw (Ed.), *Functional food, nutraceutical or pharmaceutical?* London: IBC. pp: 15-26.
- De Flora, S. (1998). Mechanisms of inhibitors of mutagenesis and carcinogenesis. *Mutat. Res.* 402 : 151-158.
- De Oliveria, D.M.; Barreto, G.; De Andrade, D.V.; Saraceno, E.; Aon-Bertolino, L.; Capani, F.; Dos Santos El Bachá, R.; Giraldez, L.D. (2009). Cytoprotective effect of *Valeriana officinalis* extract on an *in vitro* experimental model of Parkinson disease. *Neurochem. Res.* 34 (2), pp: 215-20.
- Del Valle-Mojica, L.M.; Ayala-Marín, Y.M.; Ortiz-Sanchez, C.M.; Torres-Hernández, B.A.; Abdalla-Mukhaimer, S.A.; Ortiz, J.G. (2011). Selective Interactions of *Valeriana officinalis* Extracts and Valerenic Acid with [³H]Glutamate Binding to Rat Synaptic Membranes. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine.* 2011, pp: 1-7.
- Desmarchelier, C.; Mongelli, E.; Coussio, J.; Ciccia, G. (1997). Evaluation of the *in vitro* antioxidant activity in extracts of *Uncaria tomentosa*. *Phytother. Res.* 11, pp: 254-256.
- Diario Oficial de la Unión Europea (21-11-2011), L 304/18. (<http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2011:304:0018:0063:ES:PDF>).
- Directive 2002/46/EC of the European Parliament and of the Council of 10 June 2002. Common position adopted by the Council with a view to the adoption of a Directive of the European Parliament and of the Council on the approximation of the laws of the Member States relating to food supplements. *Council of the European Union. Brussels.*
- Directive 2004/27/EC of the European Parliament and of the Council of 31 March 2004 amending Directive 2001/83/EC of the European Parliament and of the Council of 6 November 2001 on the community code relating to medicinal products for human use. *Official Journal* 136, 30/04/2004, pp: 0034-0057.
- Doehmer, J.; Seidel, A; Glatt, H.R.; Molders, H.P.; Oesch, D. (1990). Stable expression of rat cytochrome p450 1A1 cDNA in V79 Chinese hamster cells and their use in mutagenicity testing. *Mol. Pharmacol.* 37, pp: 608-612.
- Domingues, A.; Sartori, A.; Valente, L.M.; Golim, M.A.; Siani, A.C.; Viero, R.M. (2011). *Uncaria tomentosa* aqueous-ethanol extract triggers an immunomodulation toward a TH2 cytokine profile. *Phytother. Res.* 25 (8), pp: 1229-35.
- Dorado, G.; Barbancho, M.; Pueyo, C. (1987). Coffe is highly mutagenic in the L-arabinose resistance test in *Salmonella typhimurium*. *Environ. Mutagen.* 9: 251-260.



- Du, M. Q.; Carmichael, P. L.; Philips, D. H. (1994). Induction of activating mutations in the human c-Ha-ras-1 proto-oncogene by oxygen free radicals. *Mol. Carcinogen.* 11, pp: 170-175.
- Duke, James A. (1992). Handbook of phytochemical constituents of GRAS herbs and other economic plants. Boca Raton, Fl. CRC Press.
- Dunnick, J.K.; Hailey, J.R. (1992). Toxicity and carcinogenicity studies of quercetin, a natural component of foods. *Fundamental and Applied Toxicology.* 19 (3), pp: 423-431.
- Duraj, J.; Zazrivcova, K.; Bodo, J.; Sulikova, M.; Sedlak, J. (2005). Flavonoid quercetin, but not apigenin or luteolin, induced apoptosis in human myeloid leukaemia cells and their resistant variants. *Neopl.*, 52, pp: 273-9.
- Eid, S.Y.; El-Readi, M.Z.; Wink, M. (2012). Digitonin synergistically enhances the cytotoxicity of plant secondary metabolites in cancer cells. *Phytomedicine.* 19 (14), pp: 1307-1314.
- Elegbede, J.A.; Elson, C.E.; Tanner, M.A.; Quereshi, A.; Gould, M.N. (1986). Regression of rat primary tumors following dietary d-limonene. *J. Natl. Cancer Inst.* 76, pp: 323-325.
- El Hamss, R.; Idaomar, M.; Analla, M.; Muñoz-Serrano, A.; Campos-Sánchez, J.; Alonso-Moraga, A. (1999). A dose dependent antigenotoxic effect of turmeric. *Mutat. Res.* 446, pp: 135-139.
- El Hamss, R.; Idaomar, M.; Alonso-Moraga, A.; Muñoz-Serrano, A. (2003). Antimutagenic properties of bell and black peppers. *Food Chem. Toxicol.* 41, pp: 41-47.
- El Hamss, R.; Idaomar, M.; Analla, M.; Muñoz-Serrano, A.; Campos-Sánchez, J.; Alonso-Moraga, A. (1999). A dose dependent antigenotoxic effect of turmeric. *Mutat. Res.* 446, pp: 135-139.
- Evans, P.; Hallivell, B. (2001). Micronutrients: oxidant/antioxidant status. *Br. J. Nutr.* 85. (Suppl. 2.), p: S 67.
- Fahrig, R. (1992). Tests for recombinagens in mammals *in vivo*. *Mutat. Res.* 284, pp: 177-183.
- Fahrig, R.; Rupp, M.; Zucht, A.B. (1998). Use of primary rat and human hepatocyte sandwich cultures for activation of indirect carcinogens. Monitoring of DNA breaks and gene mutations in co-cultured cells. *Toxicol. in Vitro* 12, pp: 431-436.
- Fang, J.; Zhou, Q.; Liu, L. Z.; Xia, C.; Hu, X.; Shi, X.; Jiang, B. H. (2007). Apigenin inhibits tumor angiogenesis through decreasing HIF-1 α and VEGF expression. *Carcinogen.* , 28, pp: 858-864.
- Ferguson, L. R. (1994). Antimutagens as cancer chemopreventive agents in the diet. *Mutat. Res.* 307: 395-410.
- Ferguson, L. R. (2001). Role of plant polyphenols in genomic stability. *Mutat. Res.* 475, pp: 89-111.



- Ferguson, L. R.; Harris, P. J. (1998). Suberized plant cell walls suppress formation of heterocyclic amine-induced aberrant crypts in a rat model. *Chem. Biol. Interactions*. 114, pp: 191-209.
- Fernández-Armesto, F. (2001). Food, a History. *Macmillan*, Oxford.
- Fernández-Bedmar, Z.; Anter, J.; de la Cruz-Ares, S.; Muñoz-Serrano, A.; Alonso-Moraga, A.; Pérez-Guisado, J. (2011). Role of citrus juices and distinctive components in the modulation of degenerative processes: genotoxicity, antigenotoxicity, cytotoxicity, and longevity in *Drosophila*. *J. Toxicol. Environ. Health A*. 74 (15-16), pp: 1052-66.
- Ferry, D.R.; Smith, A.; Malkhandi, J.; Fyfe, D.W.; deTakats, P.G.; Anderson, D.; Baker, J.; Kerr, D.J. (1996). Phase I clinical trial of the flavonoid quercetin: pharmacokinetics and evidence for in vivo tyrosine kinase inhibition. *Clin. Cancer Res*. 2 (4), pp: 659-68.
- Fesus, L., Szondy, Z., Uray, I. (1995). Probing the molecular program of apoptosis by cancer chemopreventive agents. *J. Cell Biochem. Suppl*. 22, pp: 151-161.
- Fitzpatrick, F. A. (2001). Inflammation, carcinogenesis and cancer. *In. Immunopharmacol*. 1, pp: 1651-1667.
- FlayBase, <http://flybase.org/>
- Font Quer, P. (1978). Plantas Medicinales. El Dioscórides. Renovado. *Ed. Labor S.A.*
- Franzios, G.; Mirotsoy, M.; Hatzia Apostolou, E.; Kral, J.; Scouras, Z.G.; Mavragani-Tsipidou, P. (1997). Insecticidal and Genotoxic Activities of Mint Essential Oils. *J. Agric. Food Chem*. 45 (7), pp: 2690-2694.
- Frassinetti, S.; Croce, C.M.D.; Caltavuturo, L.; Longo, V. (2012). Antimutagenic and antioxidant activity of Lisosan G in *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Chem*. 135, pp: 2029-2034.
- Frei, H.; Würigler, F. E. (1988). Statistical methods to decide whether mutagenicity test data from *Drosophila* assays indicate a positive, negative, or inconclusive result. *Mutat. Res*. 203, pp: 297-308.
- Frei, H.; Würigler, F. E. (1995). Optimal experimental design and sample size for the statistical evaluation of data from Somatic Mutation and Recombination Tests (SMART) in *Drosophila*. *Mutat. Res*. 334, pp: 247-258.
- Fridovich, I. (1989). Superoxide dismutases. An adaptation to a paramagnetic gas. *J. Biol. Chem*. 264 (14), pp: 7761-7764.
- Frölich, A.; Würigler, F. E. (1989). New tester strains with improved bioactivation capacity for the *Drosophila* wing-spot test. *Mutat. Res*. 216, pp: 179-187.
- Frölich, A.; Würigler, F. E. (1990 a). Genotoxicity of ethyl carbamate in the *Drosophila* wing-spot test: dependence on genotype-controlled metabolic capacity. *Mutat. Res*. 244, pp: 202-208.



- Frölich, A.; Würigler, F. E. (1990 b). *Drosophila* wing-spot test: improved detectability of genotoxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Mutat. Res.* 234, pp: 71-80.
- Frölich, A.; Würigler, F. E. (1991). The "High Bioactivation" cross for the SMART assay with the wing. *D. I. S.*, 70, pp: 246-247.
- Fukumoto, L. R.; Mazza, G. (2000). Assessing Antioxidant and Prooxidant Activities of Phenolic Compounds. *J. Agric. Food Chem.* 48, pp: 3597-3604.
- Gaivao, I.; Sierra, L. M.; Comendador, M. A. (1999). The w/w⁺ SMART assay of *Drosophila melanogaster* detects the genotoxic effects of reactive oxygen species inducing compounds. *Mutat. Res.* 440: 139-145.
- Gallagher, R.E.; Salahuddin, S.Z.; Hallo, W.T.; McCredie, K.B.; Gallo, R.C. (1975). Growth and differentiation in culture of leukemic leukocytes from a patient with acute myelogenous leukemia and re-identification of type-C virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 72, pp: 4137-4141.
- Gallagher, R.; Collins, S.; Trujillo, J.; McCredie, K.; Ahearn, M.; Tsai, S.; Metzgar, R.; Aulakh, G.; Ting, R.; Ruscetti, F.; Gallo, R. (1979). Characterization of the continuous, differentiating myeloid cell line (HL60) from a patient with acute promyelocytic leukemia. *Blood.* 54, pp: 713-733.
- García-Bellido, A.; Merriam, J. R. (1971). Parameters of the wing imaginal disc development of *Drosophila melanogaster*. *Dev. Biol.* 24, pp: 61-87.
- Ghosh, R.; Mitchell, D. L. (1999). Effect of oxidative DNA damage in promoter elements on transcription factor binding. *Nucleic Acids Res.* 27, pp: 3213-3218.
- Gibbs, S.; van de Sandt, J.J.; Merk, H.F.; Lockley, D.J.; Pendlington, R.U.; Pease, C. K. (2007). Xenobiotic metabolism in human skin and 3D human skin reconstructs: a review. *Curr. Drug. Metabol.* 8(8), pp: 758-72.
- Gichner, T.; Pospisil, F.; Veleminsky, J.; Volkeova, V.; Volke, J. (1987). Two types of antimutagenic effects of gallic and tannic acids towards N-nitroso-compounds- induced mutagenicity in the Ames *Salmonella* assay. *Folia. Microbiol.* 32, pp: 55-62.
- Gilly, G.; Garner, J.; Racine, P. (1986). Menthes poivrées. Composition chimique, analyse chromatographique. *Parfums Cosmét. Arômes.* 71, pp : 79-86.
- Golalipour, M. J.; Gharravi, A. M.; Ghafari, S.; Afshar, M. & Khori, V. (2008). Effects of *Crocus sativus* on the fetal development of NMRI mice. *Saudi Med. J.* 29 (2), pp: 309-10.
- Golalipour, M.J.; Ghafari, S.; Maleki, A.; Kiani, M.; Asadi, E.; Farsi, M. (2011). Study of Embryotoxicity of *Mentha piperita* L. during Organogenesis in Balb/ Mice. *Int. J. Morphol.* 29 (3), pp: 862-867.



- Gomes-Carneiro, M. R.; Dias, D. M.; De-Oliveira, A. C. ; Paumgarten, F. J. (2005) Evaluation of mutagenic and antimutagenic activities of alpha-bisabolol in the *Salmonella*/microsome assay. *Mutat Res.* 585, pp: 105-112.
- Gomes-Carneiro, M.R.; Felzenszwalb, I.; Paumgarten, F.J.R. (1998). Mutagenicity testing of (\pm)-camphor, 1,8-cineole, citral, citronellal, (-)-menthol and terpineol with the *Salmonella*/microsome assay. *Mutat. Res.* 416 (1-2), pp: 129-136.
- Gonçalves, C. ; Diris, T. ; Batista, M.T. (2005). Antioxidant properties of proanthocyanidins of *Uncaria tomentosa* bark decoction: a mechanism for anti-inflammatory activity. *Phytochemistry.* 66 (1), pp: 89-98.
- Gordon, W.P.; Forte, A.J.; MacMurtry, R.J.; Gal, J.; Nelson, S.D. (1982). Hepatotoxicity and pulmonary toxicity of pennyroyal oil and its constituent terpenes in the mouse. *Toxicology and Applied Pharmacology.* 65 (3), pp: 413-424.
- Gordon, W.P.; Huitric, A.C.; Seth, C.L.; McClanahan, R.H.; Nelson, S.D. (1987). The metabolism of the abortifacient terpene, (R)-(+)-pulegone, to a proximate toxin, menthofuran. *Drug Metabol. Disposition.* 15 (5): 589-594.
- Gore, S.D.; Samid, D.; Weng, L.J. (1997). Impact of the putative differentiating agents sodium phenylbutyrate and sodium phenylacetate on proliferation, differentiation, and apoptosis of primary neoplastic myeloid cells. *Clin. Cancer Res.* 10, pp: 1755-1762.
- Goun, E.A.; Petrichenko, V.M.; Solodnikov, S.U.; Suhinina, T.V.; Kline, A.; Cunningham, G.; Nguyen, C.; Miles, H. (2002). Anticancer and antithrombin activity of Russian plants. *J. Ethnopharmacology.* 81, pp: 337-342.
- Graf, U. (1986). Temperature effect on *mwh* expression in the wing somatic mutation and recombination test in *Drosophila*. *D. I. S.* 63, p: 65.
- Graf, U.; Abraham, S. K.; Guzmán-Rincón, J.; Würigler, F. E. (1998). Antigenotoxicity studies in *Drosophila melanogaster*. *Mutat. Res.* 402, pp: 203-209.
- Graf, U.; Alonso-Moraga, A.; Castro, R.; Carrillo, E. (1994). Genotoxicity testing of different types of beverages in the *Drosophila* wing somatic mutation and recombination test. *Food Chem. Toxicol.* 32(5): 423-430.
- Graf, U.; Badoux, M.; Hollinger, E. (1992 a). The carcinogen DAB is highly genotoxic in the improved high bioactivation cross of the *Drosophila* wing spot test (SMART). *D. I. S.* 71, pp: 235-236.
- Graf, U.; Frei, H.; Kägi, A.; Katz, A. J.; Würigler, F. E. (1989). Thirty compounds tested in the *Drosophila* wing spot test. *Mutat. Res.* 222, pp: 359-373.



- Graf, U.; Heo, Ok-Soom; Olvera Ramirez, O. (1992b). The genotoxicity of chromium (VI) oxide in the wing spot test of *Drosophila melanogaster* is over 90% due to mitotic recombination. *Mutat. Res.* 266: 197-203.
- Graf, U.; Juon, H.; Katz, A. J.; Frei, H.; Würgler, F. E. (1983). A pilot study on a new *Drosophila* spot test. *Mutat. Res.* 120, pp: 233-239.
- Graf, U. ; van Schaik, N. (1992). Improved high bioactivation cross for the wing somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Mutat. Res.* 271, pp: 59-67.
- Graf, U.; Würgler, F. E.; Katz, A. J.; Frei, H.; Juon, H.; Hall, C. B.; Kale, P. G. (1984). Somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Environ. Mutagen.* 6, pp: 153-188.
- Guan, S.; Ge, D.; Liu, T.Q.; Ma, X.H.; Cui, Z.F. (2009). Protocatechuic acid promotes cell proliferation and reduces basal apoptosis in cultured neural stem cells. *Toxicol. In Vitro.* 23, pp: 201-208.
- Guan, S.; Zhang, X.L.; Ge, D.; Liu, T.Q.; Ma, X.H.; Cui, Z.F. (2011). Protocatechuic acid promotes the neuronal differentiation and facilitates survival of phenotypes differentiated from cultured neural stem and progenitor cells. *Eur. J. Pharmacol.* 670, pp: 471-478.
- Guevara, A.P.; Vargas, C.; Sakurai, H.; Fujiwara, Y.; Hashimoto, K.; Maoka, T.; Kozuka, M.; Ito, Y.; Tokuda, H.; Nishino, H. (1999). An antitumor promotor from *Moringa oleifera*. *Lam. Mutat. Res.* 440, pp: 181-188.
- Guimarães, N.N.; Silva, C.J.; Andrade, H.H.R.; Dihl, R.R.; Lehmann, M.; Cunha, K.S. (2012). Comparative analysis of genetic toxicity of antiretroviral combinations in somatics cells of *Drosophila melanogaster*. *Food Chem. Toxicol.* <http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2012.12.005>.
- Gulati, Om. P.; Ottaway, P.B. (2006). Legislation relating to nutraceuticals in the European Union with a particular focus on botanical-sourced products. *Toxicology.* 221, pp: 75-87.
- Gupta, R.; Dani, H. M. (1989). In vitro formation of organ-specific ultimate carcinogens of 4-dimethylaminoazobenzene and urethane by microsomes. *Toxicol. Lett.* 45, pp: 49-53.
- Gupta, S.C.; Kim, J.H.; Prasad, S.; Aggarwal, B.B. (2010). Regulation of survival, proliferation, invasion, angiogenesis, and metastasis of tumor cells through modulation of inflammatory pathways by nutraceuticals. *Cancer Metastasis Rev.* 29 (3), pp: 405-434.
- Haag, J.D.; Lindstrom, M.J.; Gould, M.N. (1992).Limonene-induced regression of mammary carcinomas. *Proc. Am. Assoc. Cancer Res.* 52, pp: 4021-4026.
- Harborne, J.B.; Williams, C.A. (2000). Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry.* 55, pp: 481-504.



- Harris, C. C. (1991). Chemical and physical carcinogenesis: advances and perspectives for the 1990s. *Cancer Res.* (suppl.) 51, pp: 5023-5044.
- Harris, P.N.; Chen, K.K. (1970). Development of hepatic tumours in rats following ingestion of *Senecio longilobus*. *Cancer Res.* 30, pp: 2881-2886.
- Harwood, M.; Danielewska-Nikiel, B.; Borzelleca, J.F.; Flamm, G.W.; Williams, G.M.; Lines, T.C. (2007). A critical review of the data related to the safety of quercetin and lack of evidence of *in vivo* toxicity, including lack of genotoxic/carcinogenic properties. *Food Chem. Toxicol.* 45, pp: 2179-205.
- Hashemi, M.; Nouri, L.M.; Entezari, M.; Nafisi, S.; Nowroozii, H. (2010). Anti-mutagenic and pro-apoptotic effects of apigenin on human chronic lymphocytic leukemia cells. *Acta Med. Iran.* 48 (5), PP: 283-8.
- Hastings, P. J. (1992). Mechanism and control of recombination in fungi. *Mutat. Res.* 284, pp: 97-110.
- Haworth, S.; Lawlor, T.; Mortelmans, K.; Speck, W.; Zeiger, E. (1983). Salmonella mutagenicity test results for 250 chemicals. *Environ. Mutagen.* 1 (Suppl.), pp: 3-142.
- Hayatsu, H.; Inade, N.; Kakutani, T.; Arimoto, S.; Negishi, T.; Mori, K.; Okuda, T.; Sakata, I. (1992). Suppression of genotoxicity of carcinogens by (-) epigallocatechin gallate. *Prev. Med.* 21, pp: 370-376.
- Heber, D. (1997). The stinking rose: organosulfur compounds and cancer. *Am. J. Clin. Nutr.* 66, pp: 425-426.
- Helbock, H. J.; Beckman, K. B.; Shigenaga, M. K.; Walter, P. B.; Woodall, A. A.; Yeo, H. C.; Ames, B. N. (1998). DNA oxidation matters: the HPLC-electrochemical detection assay of 8-oxo-deoxyguanosine and 8-oxo-guanine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95, pp: 288-293.
- Hernández-Ceruelos, A.; Magrigal-Bujaidar, E.; de la Cruz, C. (2002). Inhibitory effect of chamomille essential oil on the sister chromatid exchanges induced by daunorubicin and methyl methanesulfonate in mouse bone marrow. *Toxicol. Lett.* 135, pp: 103-110.
- Hernandez-Ceruelos, A.; Magrigal-Bujaidar, E.; de la Cruz, C. (2004) Inhibitory effect of chamomile essential oil on the sister chromatid exchanges induced by daunorubicin and methyl methanesulfonate in mouse bone marrow. *Toxicol.Lett.* 150, pp: 229-230.
- Heyn, H.; Esteller, M. (2012). DNA methylation profiling in the clinic: applications and challenges. *Nat. Rev. Genet.* 13, pp: 679-692.
- Hirono, M.; Haga, M.; Fujii, M.; Matsuura, S.; Matsubara, N.; Nakayama, M.; Furuya, T.; Hikichi, M.; Takanashi, H.; Uchida, E.; Hosaba, S.; Uneno, I. (1979). Induction of hepatic tumours in rats by senkirkine and symphytine. *J. Natl. Cancer Inst.* 63, pp: 469-472.



- Hirono, M.; Mori, H.; Culvenor, C.C.J. (1976). Carcinogenic activity of coltsfoot, *Tussilago farfara* L. *Gann*. 67, pp: 125-129.
- Hirono, M.; Mori, H.; Haga, M. (1978). Carcinogenic activity of *Symphytum officinale*. *J. Natl. Cancer Inst.* 61, pp: 856-869.
- Hirono, M.; Mori, H.; Yamada, K.; Hirata, Y.; Haga, M.; Tatematsu, H.; Kanie, S. (1977). Carcinogenic activity of petasitenine, a new pyrrolozidine alkaloid isolated from *Petasites Japonicus Maxim.* *J. Natl. Cancer Inst.* 58, pp: 1155-1157.
- Hirono, I.; Ueno, I.; Hosaka, S.; Takanashi, H.; Matsushima, T.; Sugimura, T.; Natori, S. (1981). Carcinogenicity examination of quercetin and rutin in ACI rats. *Cancer Lett.* 13, pp: 15-21.
- Hirose, Y.; Tanaka, T.; Kawamori, T.; Olnishi, T.; Makita, H.; Mori, H.; Satoh, K.; Hara, A. (1995). Chemoprevention of urinary bladder carcinogenesis by the natural phenolic compound protocatechuic acid in rats. *Carcinogen.* 16, pp: 2337-2342 .
- Hoffmann, G. R. (1992). Bacterial assays for recombinagens. *Mutat. Res.* 284, pp: 125-146.
- Hofmanová, J.; Machala, M.; Kozubík, A. (2000). Epigenetic mechanisms of the carcinogenic effects of xenobiotics and in vitro methods of their detection. *Folia Biol. (Praha)*, 46 (5), pp: 165-73.
- Homburger, F.; Treger, A.; Boger, E. (1971). Inhibition of murine subcutaneous and intravenous benzo(rst)pentaphene. Carcinogenesis by sweet orange oils and D-limonene. *Oncology.* 25, pp: 1-10.
- Hong, W.K.; Sporn, M.B. (1997). Recent advances in chemoprevention of cancer. *Science* 278, pp: 1073-1077.
- Houghton, P.J. (1988). The biological activity of valeriane and related plants. *J. Ethnopharmacology.* 22, pp: 121-142.
- Houghton, P.J. 1999. The scientific basis for the reputed activity of valerian. *J. Pharmacol.* 51, 5005-512.
- Houvinen, E.; Kaprio, J.; Vesterinen, E.; Koskenvuo, M. (1997). Mortality of adults with asthma: a prospective cohort study. *Torax.* 52, pp: 49-54.
- Hu, J. J.; Dubin, N.; Kurland, D.; Ma, B. L.; Roush, G. C. (1995). The effects of hydrogen peroxide on DNA repair activities. *Mutat. Res.* 336, pp: 193-201.
- Huberman, E.; Callahan, M.F. (1979). Induction of terminal differentiation in human promyelocytic leukemia cells by tumor-promoting agents. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76, pp: 1293-1297.
- Hudson, E. A.; Dinh, P. A.; Kokubun, T.; Simmonds, M. S.; Gescher, A. (2000). Characterization of potentially chemopreventive phenols in extracts of brown rice that inhibit the growth



- of human breast and colon cancer cells. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 9, pp: 1163-70.
- Hui-lian, W.; Dong-fang, Z.; Zhao-feng, L.; Yang, L.; Qian-rong, L.; Yu-zhen, W. (2003). In vitro study on the genotoxicity of dichloromethane extracts of valerian (DEV) in human endothelial ECV304 cells and the effect of vitamins E and C in attenuating the DEV-induced DNA damages. *Toxicol. Appl. Pharm.* 188, pp: 36-41.
- Huljic, S.; Bruske, E.I.; Pfitzenmaier, N.; Brein, E.O.; Dietrich, D.R. (2008). Species-specific toxicity of aristolochic acid (AA) *in vitro*. *Toxicology in Vitro.* 22 (5), pp: 1213-1221.
- Hurrell, R.F.; Reddy, M.; Cook, J.D. (2004). Inhibition of non-haem iron absorption in man by polyphenolic-containing beverages. *Brit. J. Nutrition.* 81(4), pp: 289-295.
- Hursting, S. D.; Kari, F. W. (1999). The anti-carcinogenic effects of dietary restriction: mechanisms and future directions. *Mutat. Res.* 443, pp: 235-249.
- Idaomar, M.; El Hamss, R.; Bakkali, F.; Mezzoug, N.; Zhiri, A.; Baudoux, D.; Muñoz-Serrano, A.; Liemans, V.; Alonso-Moraga, A. (2002). Genotoxicity and antigenotoxicity of some essential oils evaluated by wing spot test of *Drosophila melanogaster*. *Mutat. Res.* 513, pp: 61-68.
- Inoue, T.; Sugimoto, Y.; Masuda, H.; Kamei, C. (2001). Effects of Peppermint (*Mentha piperita* L.) extracts on experimental allergic rhinitis in rats. *Biol. Pharm. Bull.*, 24 (1), pp:92-95.
- Ito, C.; Itoigawa, M.; Furukawa, H.; Rao, K.S.; Enjo, F.; Bu, P.; Takayasu, J.; Tokuda, H.; Nishino, H. (1998). Xanthenes as inhibitors of Epstein-Barr virus activation. *Cancer Letters.* 132, pp: 113-117.
- Jain, S.; Jain, D.K.; Balekar, N. (2012). *In-Vivo* Antioxidant activity of ethanolic extract of *Mentha pulegium* leaf against CCl₄ induced toxicity in rats. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 2 (2), pp: S737-S740.
- Janot, M.M.; Guilhem, J.; Contz, O.; Georgescu, V.; Cionga, E. (1979). Contribution à l'étude des alcaloïdes de la valériane (*Valeriana officinalis*) actinidine et naphtyridyl méthylcétone: nouvel alcaloïde. *Ann. Pharm Fr.* 37, pp: 413-420.
- Jayaprakasha, G. K.; Ohnishi-Kameyama, M.; Ono, H.; Yoshida, M.; Jaganmohan, R. L. (2006). Phenolic constituents in the fruits of *Cinnamomum zeylanicum* and their antioxidant activity. *J Agric Food Chem.* 5, pp:1672-1679.
- Jayasooriya, R.G.P.T.; Kang, S-H.; Kang, C-H.; Choi, Y.H.; Moon, D-O.; Hyun, J-W.; Chang, W-Y.; Kim, G-Y. (2012). Apigenin decreases cell viability and telomerase activity in human leukemia cell lines. *Food Chem. Toxicol.* 50 (8), pp: 2605-2611.
- Jones, K. (1995). *Cat's Claw-Healing Vine of Perú* Sylvan Press, Seattle (1995).



- Jullien, F.; Voirin, B.; Bernillon, J.; Favre-Bonvin, J. (1984). Highly oxygenated flavones from *Mentha piperita*. *Phytochemistry*. 23, pp: 2972-2973.
- Jurado, J.; Alejandre-Durán, E.; Alonso-Moraga, A.; Pueyo, C. (1991). Study on the mutagenic activity of 13 bioflavonoids with the *Salmonella* Ara test. *Mutagenesis* 6(4), pp: 289-295.
- Kalinkova, G.N. (1999). Studies of beneficial interactions between active medicaments and excipients in pharmaceutical formulations. *Int. J. Pharm.* 187, pp: 1-15.
- Kampa, M.; Alexaki, V. I.; Notas, G.; Nifli, A. P.; Nistikaki, A.; Hatzoglou, A.; Bakogeorgou, E.; Kouimtzooglou, E.; Blekas, G.; Boskou, D.; Gravanis, A.; Castanas, E. (2004). Antiproliferative and apoptotic effects of selective phenolic acids on T47D human breast cancer cells: potential mechanisms of action. *Breast Cancer Res.* 6, pp: 63-74.
- Karpouhtsis, I.; Pardali, E.; Feggou, E.; Kokkini, S.; Scouras, Z.G.; Mavragani-Tsipidou, P. (1998). Insecticidal and Genotoxic Activities of Oregano Essential Oils. *J. Agric. Food Chem.* 46 (3), pp: 1111-1115.
- Kastenbaum, M.A.; Bowman, K.O. (1970). Tables for determining the statistical significance of mutation frequencies. *Mutat. Res.*, 9. pp: 527-549.
- Kawamori, T.; Tanaka, T.; Hirose, Y.; Ohnishi, M.; Mori, H. (1996). Inhibitory effects of D-limonene on the development of colonic aberrant crypt foci induced by azoxymethane in F344 rats. *Carcinogenesis*. 17, pp: 369-372.
- Keplinger, K. (1982). Cytostatic, contraceptive and anti-inflammatory agents from *Uncaria tomentosa*. *PCT Int. Appl. WO.* 8201, p: 130.
- Keplinger, K.; Laus, G.; Wurm, M.; Dierich, M.P.; Teppener, H. (1999.) *Uncaria tomentosa* (Willd) D.C.-Ethnomedicinal use and new pharmacological, toxicological and botanical results. *J. Ethnopharmacology*. 64, pp: 23-24.
- Keplinger, K.; Laus, G.; Wurm, M.; Dierich, M.P.; Teppner, H. (1998). *Uncaria tomentosa* (Willd) D.C.-Ethnomedicinal use and new pharmacological, toxicological and botanical results. *J. Ethnopharmacology* 64 (1), pp: 23-24.
- Kerr, J.F.R.; Harmon, B.V. (1991). Definition and incidence of apoptosis: an historical perspective. In: Tomei LD, Cope FO, (eds.). *Apoptosis: The Molecular Basis of Cell Death*. Current Communications in Cell and Molecular Biology Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Kiffe, M.; Christen, P.; Arni, P. (2003). Characterization of cytotoxic and genotoxic effects of different compounds in CHO K5 cells with the comet assay (single-cell gel electrophoresis assay). *Mutat. Res.* 537, pp: 151-168.
- Kim, S-H.; Lee, S.; Piccolo, S.R.; Allen-Brady, K.; Park, E-J.; Chun, J.N.; Kim, T.W.; Cho, N-H.; So, I.; Jeon, J-H. (2012). Menthol induces cell-cycle arrest in PC-3 cells by down-



- regulating G2/M genes, including polo-like kinase 1. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 422 (3), pp: 436 – 441.
- Kimura, S.; Maekawa, T.; Hirakawa, K.; Murakami, A.; Abe, T. (1995). Alterations of c-myc expression by antisense oligonucleotides enhance the induction of apoptosis in HL-60 cells. *Cancer Res.* 55, p: 1379.
- Koeffler, H.P. (1983). Induction of differentiation of human acute myelogenous leukemia cells: therapeutic implications. *Blood.* 62, pp: 709-721.
- Kováčik, J.; Grúz, J.; Bačkor, M.; Tomko, J.; Strnad, M.; Repčák, M. (2008). Phenolic compounds composition and physiological attributes of *Matricaria chamomilla* grown in copper excess. *Environ. Exp. Botany.* 62 (2), pp: 145-152.
- Kruk, I. (1998). Environmental Toxicology and Chemistry of Oxygen Species. *Springer-Verlag. Berlin.*
- Ksouri, R.; Ksouri, W.M.; Jallali, I.; Debez, A.; Magné, C.; Hiroko, I.; Abdelly, D. (2012). Medicinal halophytes: potent source of health promoting biomolecules with medical, nutraceutical and food applications. *Crit. Rev. Biotechnol.* 32 (4), pp: 289-326.
- Kuhara, K.; Takanashi, H.; Hirono, I.; Furuya, T.; Asada, Y. (1980). Carcinogenic activity clivorine, a pyrrolizidine alkaloid isolated from *Ligularia dentata*. *Cancer Lett.* 10, pp: 117-122.
- Kuo, M. L.; Lee, K. C.; Lin, J. K. (1992) Genotoxicities of nitropyrenes and their modulation by apigenin, tannic acid, ellagic acid and indole-3-carbinol in the *Salmonella* and CHO systems. *Mutat Res.* 270, pp: 87-95.
- Kwak, N-S.; Jukes, D.J. (2001). Functional foods. Part. 2: the impact on current regulatory terminology. *Food Control.* 12, pp: 109-117.
- Lamson, D.W.; Brignal, M.S. (2000). Antioxidants and cancer, part 3: quercetin. *Altern. Med. Rev.* 5, pp: 196-208.
- Lappas, C.M.; Lappas, N. (2012). D-Limonene modulates T lymphocyte activity and viability. *Cell. Immunol.* 279 (1), pp: 30-41.
- La Rotta-Hernández, C. E. 2007. Electrogeneration of hydrogen peroxide applied to the peroxide-mediated oxidation of (*R*) - limonene in organic media. *Electron. J. Biotechnol.* 10, pp: 522–35.
- Lazutka, J.R.; Mierauskienė, J.; Slapsytė, G.; Dedonytė, V. (2001). Genotoxicity of dill (*Anethum graveolens* L.), peppermint (*Mentha X piperita* L.) and pine (*Pinus sylvestris* L.) essential oils in human lymphocytes and *Drosophila melanogaster*. *Food and Chemical Toxicology.* 39, pp: 485-492.
- Lea, M.A. (1996). Organosulfur compounds and cancer. *Adv. Exp. Med. Biol.* 401, pp: 147–154



- Leathwood, P.D.; Chauffard, F.(1983). Quantifying the effects of mild sedatives. *J. Psychiatr. Res.* 17, pp: 115-122.
- Leathwood, P.D.; Chauffard, F. (1985). Aqueous extract of valerian reduces latency to fall asleep in Mice. *Planta Med.* 51, pp: 144-148.
- Li, Y.; Sun, X.; LaMont, J.T.; Pardee, A.B.; Li, C.J. (2003). Selective killing of cancer cells by beta-lapachone: direct checkpoint activation as a strategy against cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 100, pp: 2674-2678.
- Li, P.; Wang, X. Q.; Wang, H. Z.; Wu, Y. N. (1993). High performance liquid chromatographic determination of phenolic acids in fruits and vegetables. *Biomed. Environ. Sci.* 6, pp: 389-398.
- Lin, C.Y.; Huang, C.S.; Huang, C.Y.; Yin, M.C. (2009). Anticoagulatory, antiinflammatory, and antioxidative effects of protocatechuic acid in diabetic mice. *J. Agric. Food Chem.* 57, pp: 6661–6667.
- Lin, J.P., Lu, H.F.; Lee, J.H.; Lin, J.G.; Hsia, T.C.; Wu, L.T.; Chung, J.G. (2005). (-)-Menthol inhibits DNA topoisomerases I, II alpha and beta and promotes NF-kappaB expression in human gastric cancer SNU-5 cells. *Anticancer Res.* 25 (3B), pp: 2069-74.
- Lindsley, D. L.; Zimm, G.G. (1992). The genome of *Drosophila melanogaster*. *Academic Press, Inc.* San Diego.
- Liu, CL.; Wang, J. M.; Chu, C. Y.; Cheng, M. T.; Tseng, T. H. (2002). In vivo protective effect of protocatechuic acid on tert-butyl hydroperoxide-induced rat hepatotoxicity. *Food Chem. Toxicol.* 40, pp: 635-641.
- Liu, G. T.; Zhang, T. M.; Wang, B. E.; Wang, Y. W. (1992). Protective action of seven natural phenolic compounds against peroxidative damage to biomembranes. *Biochem. Pharmacol.* 43, pp: 147-52.
- Lodovici, M.; Guglielmi, F.; Meoni, M.; Dolara, P. (2001). Effect of natural phenolic acids on DNA oxidation in vitro. *Food Chem. Toxicol.*, 39, pp: 1205-1210.
- Longstaff, M. A.; McNabb, J. M. (1991). The inhibitory effects of hull polysaccharides and tannins of field beans (*Vicia faba* L.) on the digestion of amino acids, starch and lipid, and on digestive activities in young chicks. *Br. J. Nutr.* 65, pp: 199-216.
- López, A.; Xamena, N.; Marcos, R.; Velázquez, A. (2002). Germ cells microsatellite instability the effect of different mutagens in a mismatch repair mutant of *Drosophila (spel1)*. *Mutat. Res.* 514, pp: 87-94.
- Lu, H.F.; Liu, J.Y.; Hsueh, S.C.; Yang, Y.Y.; Yang, J.S.; Tan, T.W.; Kok, L.F.; Lu, C.C.; Lan, S.H.; Wu, S.Y.; Liao, S.S., Ip, S.W.; Chung, J.G. (2007). (-)-Menthol inhibits WEHI-3 leukemia cells *in vitro* and *in vivo*. *In Vivo.* 21 (2), pp: 285-9.



- Lu, G. X.; Zhan, L. B.; Feng, B. A.; Qu, M. Y.; Yu, L. H.; Xie, J. H. (2004). Inhibition of growth and metastasis of human gastric cancer implanted in nude mice by *d*-limonene. *World J. Gastroenterol.* 10, pp: 2140–44.
- Makris, D. P.; Rossiter, J. T. (2001). Comparison of quercetin and a non-orthohydroxy flavonol as antioxidants by competing in vitro oxidation reactions. *J. Agric. Food Chem.* 49, pp: 3370-3377.
- Maltzman, T.H.; Hurt, L.M.; Elson, C.E.; Tanner, M.A.; Gould, M.N. (1989). The prevention of nitrosomethylurea-induced mammary tumors by d-limonene and orange oil. *Carcinogenesis* 10, pp: 781-3.
- Manuele, M.G.; Ferraro, G.; Anesini, C. (2008). Effect of *Tilia x viridis* flower extract on the proliferation of a lymphoma cell line and on normal murine lymphocytes: contribution of monoterpenes, especially limonene. *Phytother Res.* 22 (11), pp:1520-6.
- Masella, R.; Cantafora, A.; Modesti, D.; Cardilli, A.; Gennaro, L.; Bocca, A.; Coni, E. (1999). Antioxidant activity of 3,4-DHPEA-EA and protocatechuic acid: a comparative assessment with other olive oil biophenols. *Redox Rep.* 4, pp: 113-121.
- Matsuhisa, T. (1995). Mode of differentiation of human promyelocytic leukemia cell line, HL60, by $1\alpha,25$ -dihydroxyvitamin D₃. *Blood Cell Mol. Dis.* 21, pp: 42-48.
- Mattocks, A.R.; Cabral, J.R. (1982). Carcinogenicity of some pyrrolic pyrrolizidine alkaloid metabolites and analogues. *Cancer Lett.* 17 (1), pp: 61-66.
- McCann, J.; Chio, E.; Yamasaki, E.; Ames, B. N. (1975). Detection of carcinogens as mutagens in the *Salmonella* / microsome test: Assay of 300 chemicals. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 72 (12), pp: 5135-5139.
- Meadows, G.G. (2012). Diet, nutrients, phytochemicals, and cancer metastasis suppressor genes. *Cancer Metastasis Rev.* 31(3-4), pp: 441-54.
- Mendanha, S. A.; Moura, S.S.; Anjos, J.L.; Valadares, M.C.; Alonso, A. (2013). Toxicity of terpenes on fibroblast cells compared to their hemolytic potential and increase in erythrocyte membrane fluidity. *Toxicology in Vitro.* 27, pp: 323-329.
- Miliauskas, G.; Venskutonis, P.R.; van Beek, T.A. (2004). Screening of radical scavenging activity of some medical and aromatic plant extracts. *Food Chemistry.* 85, pp: 231-237.
- Mirvish, S. S. (1968). The carcinogenic action and metabolism of urethan and N-hydroxyurethan. *Adv. Cancer. Res.* 11, pp: 1-42.
- Miyazawa, M.; Hisama, M. (2003). Antimutagenic activity of flavonoids from *Chrysanthemum morifolium*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 67, pp: 2091-2099.
- Montenegro de la Matta, S.; delle Monache, F.; Marini-Bertolo, G.B. (1976). Alkaloids and procyanidins of an *Uncaria* sp. from Perú. *Il FÁrmaco.* 31, pp: 527-535.



- Mori, H.; Kawai, K.; Ohbayashi, F.; Bunai, Y.; Yamada, K.; Hirono, I. (1984). Some toxic properties of a carcinogenic pyrrolizidine alkaloid, petasitenine. *J. Toxicol. Sci.* 9, pp: 143-147.
- Mori, H.; Matsunaga, K.; Tanakamaru, Y.; Kawabata, K.; Yamada, Y.; Sugie, S.; Nishikawa, A. (1999). Effects of protocatechuic acid, S-methylmethanethiosulfonate or 5-hydroxy-4-(2-phenyl-(E)ethenyl)-2(5H)-furanone(KYN-54) on 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone-induced pulmonary carcinogenesis in mice. *Cancer Lett.* 135, pp: 123-127.
- Moriya, M.; Slade, N.; Brdar, B.; Medvrec, Z.; Tomic, K.; Jelaković, B.; Wu, L.; Truong, S.; Fernandes, A.; Grollman, A.P. (2011). TP53 Mutational signature for aristolochic acid: an environmental carcinogen. *Int. J. Cancer.* 129 (6), pp: 1532-6.
- Morse, M.A.; Toburen, A. (1996). Inhibition of metabolic activation of 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone by limonene. *Cancer Letters.* 104 (2), pp: 211-217.
- Motohashi, N.; Yamagami, C.; Tokuda, H.; Okuda, Y.; Ichiishi, E.; Mukainaka, T.; Nishino, H.; Saito, Y. (2000). Structure-activity relationship in potentially anti-tumor promoting benzalacetone derivatives, as assayed by the Epstein-Barr virus early antigen activation. *Mutat. Res.* 464, pp: 247-254.
- Mucciarelli, M.; Camusso, W.; Berteà, C.M.; Bossi, S.; Maffei, M. (2001). Effect of (+)-pulegone and other oil components of *Mentha x piperita* on cucumber respiration. *Phytochemistry.* 57 (1), pp: 91-98.
- Murali, R.; Saravanan, R. (2012). Antidiabetic effect of D-limonene, a monoterpene in streptozotocin-induced diabetic rats. *Biomed. Preventive Nutrition.* 2 (4), pp: 269-275.
- Murthy, P.B.K.; Ahmed, M.M.; Regu, K. (1991). Lack of genotoxicity of menthol in chromosome aberration and sister chromatid exchange assays using human lymphocytes in vitro. *Toxicology in Vitro.* 5 (4), pp: 337-340.
- Nagle, A.; Goyal, A.K.; Kesarla, R.; Murthy, R.R. (2011). Efficacy study of vesicular gel containing methotrexate and menthol combination on parakeratotic rat skin model. *Liposome Res.* 21 (2), pp: 134-40.
- Nair, B. (2001). Final report on the safety assessment of *Mentha piperita* (Peppermint) Oil, *Mentha piperita* (Peppermint) Leaf Extract, *Mentha piperita* (Peppermint) leaf, and *Mentha piperita* (peppermint) Leaf Water. *Int. J. Toxicol.* 20 (3), pp: 61-73.
- Nakamura, H.; Nishikawa, A.; Furukawa, F.; Kasahara, K.; Miyauchi, M.; Son, H. Y.; Hirose, M. (2000, a). Inhibitory effects of protocatechuic acid on the post-initiation phase of hamster



- pancreatic carcinogenesis induced by N-nitrosobis(2-oxopropyl)amine. *Anticancer Res.* 20, pp: 3423-3428.
- Nakamura, Y.; Torikai, K.; Ohto, Y.; Murakami, A.; Tanaka, T.; Ohigashi, H. (2000, b). A simple phenolic antioxidant protocatechuic acid enhances tumor promotion and oxidative stress in female ICR mouse skin: dose- and timing-dependent enhancement and involvement of bioactivation by tyrosinase. *Carcinogen.*, 21, pp: 1899-1907.
- Nakamura, Y.; Torikai, K.; Ohigashi, H. (2001, a). A catechol antioxidant protocatechuic acid potentiates inflammatory leukocyte-derived oxidative stress in mouse skin via a tyrosinase bioactivation pathway. *Free Radic Biol Med.* 30, pp: 967-978.
- Nakamura, Y.; Torikai, K.; Ohigashi, H. (2001, b). Toxic Dose of a Simple Phenolic Antioxidant, Protocatechuic Acid, Attenuates the Glutathione Level in ICR Mouse Liver and Kidney. *J. Agric. Food Chem.*, 49, pp: 5674 -5678.
- National Toxicology Program. (1990). *Toxicology and carcinogenesis studies of d- limonene (CAS No. 5989-27-5) in F344 rats and B6C3F1 mice (gavage studies)*. National Toxicology Program technical report series no. 347. Bethesda, MD: NIH.
- National Toxicology Program. (2011). *Toxicology and carcinogenesis studies of pulegone (CAS No. 89-82-7) in F344/N rats and B6C3F1 mice (gavage studies)*. National Toxicology Program. Publication N° 11-5905.
- Negishi, T.; Arimoto, S.; Nishizaki, C.; Hayatsu, H. (1989). Inhibitory effect of chlorophyll on the genotoxicity of 3-amino-1-methyl-5H-pyrido[4,3-b]indole (Trp-P-2). *Carcinogenesis.* 10, pp: 145-149.
- Negishi, T.; Nakano, H.; Kitamura, A.; Itome, C.; Shiotani, T.; Hayatsu, H. (1994). Inhibitory activity of chlorophyllin on the genotoxicity of carcinogens in *Drosophila*. *Cancer Lett.* 83, pp: 157-164.
- Nettleship, A.; Henshaw, P. S. (1943). Induction of pulmonary tumors in mice with ethyl carbamate (urethane). *J. Natl. Cancer Inst.* 4, pp: 309-317.
- Newton, S.M.; Lau, C.; Gurcha, S.S.; Besra, G.S.; Wrigth, C.W. (2002). The evaluation of forty-three plant species for in vitro antimycobacterial activities; isolation of active constituents from *Psoralea corylifolia* and *Sanguinaria Canadensis*. *J. Ethnopharmacology.* 79 (1), pp: 57-67.



- Nickla, H.; Anderson, J.; Palzkill, T. (1983). Enzymes involved in oxygen detoxification during development of *Drosophila melanogaster*. *Experientia* 39: 610-612.
- Noel, S.; Kasinathan, M.; Rath, S. K. (2006). Evaluation of apigenin using in vitro cytochalasin blocked micronucleus assay. *Toxicology in Vitro*. 20, pp: 1168-1172.
- Nortier, J.; Vanherweghem, J.L. (2007). For patients taking herbal therapy – lessons from aristolochic acid nephropathy. *Nephrol. Dial. Transplant*. 22, pp: 1512–1517.
- Ohnishi, M.; Yoshimi, N.; Kawamori, T.; Ino, N.; Hirose, Y.; Tanaka, T.; Yamahara, J.; Miyata, H.; Mori, H. (1997). Inhibitory effects of dietary protocatechuic acid and costunolide on 7,12-dimethylbenz[a]anthracene-induced hamster cheek pouch carcinogenesis. *Jpn J Cancer Res*. 88, pp: 111-119.
- Olvera, O.; Zimmering, S.; Arceo, C.; Cruces, M.(1993). The protective effects of chlorophyllin in treatments with chromium (VI) oxide in somatic cells of *Drosophila*. *Mutat. Res*. 301, pp: 201-204.
- Olvera, O.; Zimmering, S.; Arceo, C.; Guzman, J.; Rosa, M. E. (1995). Evidence for the protective effect of ascorbic acid (vitamin C) in treatment with gamma-rays and chromium (VI) oxide (CrO₃) in somatic cells of *Drosophila*. *Mutat. Res*. 346, pp: 19-21.
- Osaba, L. (1995). Detección de actividad genotóxica mediante el ensayo de mutación y recombinación somática en alas de *Drosophila melanogaster*. Análisis de 14 plaguicidas. Tesis Doctoral. Universidad del País Vasco.
- Osaba, L.; Aguirre, A.; Alonso, A.; Graf, U. (1999). Genotoxicity testing of six insecticides in two crosses of the *Drosophila* wing spot test. *Mutat. Res*. 439, pp: 49-61.
- Osaba, L.; Rey, M. J.; Aguirre, A.; Alonso, A.; Graf, U. (2002). Evaluation of genotoxicity of captan, maneb and zineb in the wing spot test of *Drosophila melanogaster*: role of nitrosation. *Mutat. Res*. 518, pp: 95-106.
- Oster, I. I. (1955). The induction of mutations in *Drosophila melanogaster* by orally administered ethyl carbamate (urethane). *Genetics* 40, pp: 588-589.
- Pacella, R. E. (1992). Genotoxicity of mycotoxins in an improved *Drosophila* wing spot test and other short-term tests. Tesis Doctoral. *Universidad de Witwatersrand. Johannesburg*.
- Parija, T.; Das, B. R. (2003). Involvement of YY1 and its correlation with c-myc in NDEA induced hepatocarcinogenesis, its prevention by *d*-limonene. *Mol. Biol. Rep*. 30, pp: 41–46.
- Pavanello, S.; Clonfero, E. (2000). Biological indicators of geotoxic risk and metabolic polymorphisms. *Mutat. Res*. 463, pp: 285-308.
- PDR for Herbal Medicines. (2000). Medical Economics Company, Montvale. Second Edition.



- Peng, C.C.; Hsieh, C.L.; Ker, Y.B.; Wang, H.Y.; Chen, K.C.; Peng, R.Y. (2012). Selected nutraceutical screening by therapeutic effects on doxorubicin-induced chronic kidney disease. *Mol. Nutr. Food Res.* 56 (10), pp: 1541-58.
- Peto, R.; Doll, R.; Buckley, J.D.; Sporn, M.B. (1981). Can dietary β -carotene materially reduce human cancer rates? *Nature.* 290, p: 201.
- Pfau, W.; Schmeiser, H.H; Wiessler, M. (1990). Aristolochic acid binds covalently to the exocyclic amino group of purine nucleotides in DNA. *Carcinogenesis.* 11 (2), pp: 313-319.
- Phytochemical and Ethnobotanical Databases (PAEDBs), Agricultural Research Service, Estados Unidos (<http://www.ars-grin.gov/duke/index.html>).
- Pilarski, R.; Zielinski, H.; Ciesiolka, D.; Gulewicz, K. (2006). Antioxidant activity of ethanolic and aqueous extracts of *Uncaria tomentosa* (Willd.) DC. *J Ethnopharmacol.* 104 (1-2), pp: 18-23.
- Pichon, M.; Legault, J.; Gauthier, C.; Pichette, A. (2009). Synthesis and cytotoxicity evaluation of natural α -bisabolol β -D-fucopyranoside and analogues. *Phytochemistry.* 70 (25), pp: 228-236.
- Plaumann, B.; Fritsche, M.; Rimpler, H.; Brandner, G.; Hess, R. D. (1996) Flavonoids activate wild-type p53. *Oncogene.* 138, pp: 1605-1614.
- Postlethwait, J. H. (1978) Clonal analysis of *Drosophila* cuticular patterns. En: The Genetics and Biology of *Drosophila*: 2C. Editado por Ashburner, M. & Wright, T. R. F. Academic Press, London.
- Prakash, A.S.; Pereira, T.N.; Reilley, P.E.B.; Seawright, A.A. (1999). Pyrrolizidine alkaloids in human diet. *Mutat. Res.* 443, pp: 53-67.
- Prasain, J.K.; Wang, C.C.; Barnes, S. (2004). Mass Spectrometric Methods for the determination of flavonoids in biological samples. *Free Radical Biol. & Med.* 37 (9), pp: 1324 -1350.
- Qiao, Y.; Xiang, Q.; Yuan, L.; Xu, L.; Liu, Z.; Liu X. (2013). Herbacetin induces apoptosis in HepG2 cells: Involvements of ROS and PI3K/AKT pathway. *Food Chem. Toxicol.* 51, pp: 426-433.
- Rabi, T.; Bishayee, A. (2009). Terpenoids and breast cancer chemoprevention. *Breast Cancer Res. Treat.* 115, pp: 223-239.
- Radak, Z.; Zhao, Z.; Goto, S.; Koltai, E. (2011). Age-associated neurodegeneration and oxidative damage to lipids, proteins and DNA. *Oxidat. Dam.Dis.* 32 (4-6), pp: 305-315.
- Raffray, M.; Cohen, G.M. (1997). Apoptosis and necrosis in toxicology: a continuum or distinct models of cell death. *Pharmacol. Ther.* 75, pp: 153-177.
- Ramel, C. (1986). Development of short-term assays for the detection of carcinogens: genetic and molecular considerations. *Mutat. Res.* 168, pp: 327-342.



- Ramel, C. (1988). Short-term testing- are we looking at wrong endpoints?. *Mutat. Res.* 205, pp: 13-24.
- Ramel, C. (1990). Mutation spectrum in carcinogenicity. En: *Mechanisms of Environmental Carcinogenesis*. Editado por Kappas, A. Plenum Press. New York.
- Ramel, C. (1991). Pollution, carcinogenesis and cancer prevention. *Review in Oncology*, 4 (2), pp: 27-33.
- Ramirez-Victoria, P.; Guzman-Rincon, J.; Espinosa-Aguirre, J. J.; Murillo-Romero, S. (2001). Antimutagenic effect of one variety of green pepper (*Capsicum spp.*) and its possible interference with the nitrosation process. *Mutat. Res.* 496, pp: 39-45.
- Ramos, A.A.; Lima, C.F.; Pereira, M.L.; Fernandes-Ferreira, M.; Pereira-Wilson, C. (2008). Antigenotoxic effects of quercetin, rutin and ursolic acid on HepG2 cells: Evaluation by the comet assay. *Toxicology Letters*. 177 (1), pp: 66-73.
- Ranganathan, S.; Ciacco, P. J.; Tew, K. D. (1993). Principles of drug modulation applied to glutathione-S-transferases. En: *Structure and Function of Glutathione Transferases*. Editado por Tew, K. D.; Pickett, C. B.; Mantle, T. J.; Mannervik, B.; Hayes, J. D.; CRC Press. Boca Raton.
- Rao, M.S.; Reddy, J.K. (1978). Malignant neoplasms in rats fed lasiocarpine. *Cancer Res.* 37, pp: 289-293.
- Rekka, E.A.; Kourounakis, A.P.; Kourounakis, P.N. (1996). Investigation of the effect of chamazulene on lipid peroxidation and free radical processes. *Res. Commun. Mol. Pathol. Pharmacol.* 92 (3), pp: 361-364.
- Ren, N.; Charlton, J.; Adler, P.N. (2007). The flare gene, which encodes the AIP1 protein of *Drosophila*, functions to regulate F-actin disassembly in pupal epidermal cells. *Genetics*. 176, pp: 2223-2234.
- Rice-Evans, C.A.; Miller, N.J.; Paganga, G. (1996). Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Rad. Biol. Med.* 20, pp: 933-956.
- Rietjens, I.M.C.M.; Boersma, M.G.; de Haan, L.; Spenkelink, B.; Awad, H.M.; Cnubben, N.H.P.; Van Zanden, J.J.; van der Woude, H.; Alink, G.M.; Koeman, J.H. (2002). The pro-oxidant chemistry of the natural antioxidants vitamin C, vitamin E, carotenoids and flavonoids. *Environ. Tox. Pharmacol.* 11, pp: 321-333.
- Rithidech, K. N.; Tungjai, M.; Whorton, E. B. (2005). Protective effect of apigenin on radiation-induced chromosomal damage in human lymphocytes. *Mutat. Res.* 585, pp: 96-104.
- Riva, L.; Coradini, D.; Di Fronzo, G.; De Feo, V.; De Tommasi, N.; et al. (2001). The antiproliferative effects of *Uncaria tomentosa* extracts and fractions on the growth of breast cancer cell line. *Anticancer Res.* 21, pp: 2457-2461.



- Rizki, M.; Amrani, S.; Creus, A.; Xamera, N.; Marcos, R. (2001). Antigenotoxic properties of selenium. Studies in the wing spot test in *Drosophila melanogaster*. *Environ. Mol. Mutagen.* 37, pp: 70-75.
- Rizzi, R.; Re, F.; Bianchi, A.; De Feo, V.; de Simone, F.; Bianchi, L.; Stivala, L.A. (1993). Mutagenic and antimutagenic activities of *Uncaria tomentosa* and its extracts. *Journal of Ethnopharmacology.* 38, pp: 63-77.
- Roberto, D.; Micucci, P.; Sebastian, T.; Graciela, F.; Anesini, C. (2009). Antioxidant activity of limonene on normal murine lymphocytes: Relation to H₂O₂ modulation and cell proliferation. *Basic Clin. Pharmacol.* 106, pp: 38-44.
- Rodríguez-Ortega, M. J. (2003). Biomarcadores moleculares de contaminación en moluscos bivalvos del litoral andaluz. Tesis Doctoral. Universidad de Córdoba.
- Romero-Jiménez, M.; Campos-Sánchez, J.; Analla, M.; Muñoz-Serrano, A.; Alonso-Moraga, A. (2005). Genotoxicity and antigenotoxicity of some traditional medicinal herbs. *Mutat. Res.* 585, pp: 147-155.
- Romero, M.C.; Valero, A.; Martín-Sánchez, J.; Navarro-Moll, M.C. (2012). Activity of *Matricaria chamomilla* essential oil against anisakiasis. *Phytomedicine.* 19 (6), pp: 520-523.
- Ruberto, G.; Baratta, M.T. (2000). Antioxidant activity of selected essential oil components in two lipid model systems. *Food Chemistry.* 69, pp: 167-174.
- Ruela-de-Sousa, R.R.; Fuhler, G.M.; Blom, N.; Ferreira, C.V.; Aoyama, H.; Peppelenbosch, M.P. (2010). Cytotoxicity of apigenin on leukemia cell lines: implications for prevention and therapy. *Cell. Death Dis.* 1, e19. doi: 10.1038/cddis.2009.18.
- Russo, M.; Spagnuolo, C.; Tedesco, I.; Bilotto, S.; Russo, G.L. (2012). The flavonoid quercetin in disease prevention and therapy: Facts and fancies. *Biochemical Pharmacology* 83, pp: 6-15.
- Safaralie, A.; Fatemi, S.; Sefidkon, F. (2008). Essential oil composition of *Valeriana officinalis* L. roots cultivated in Iran Comparative analysis between supercritical CO₂ extraction and hydrodistillation. *J. Chromatogr.* 1180, pp: 159-164.
- Sakaguchi, N.; Inoue, M.; Ogihara, Y. (1998). Reactive oxygen species and intracellular Ca²⁺, common signals for apoptosis induced by gallic acid. *Biochem. Pharmacol.* 55, pp: 1973-1981.
- Samaneh, E.T.; Tayebbeh, R.; Hassan, E.; Vahid, N. (2010). Composition of essential oils in subterranean organs of three species of *Valeriana* L. *Nat. Prod. Res.* 24 (19), pp: 1834-42.
- Samarth, R. M.; Kumar, A. (2003). Radioprotection of Swiss albino mice by plant extract *Mentha piperita* (Linn.). *J. Radiat. Res.*, 44 (2), pp:101-9.



- Samarth, R. M.; Panwar, M.; Kumar, M. & Kumar, A. (2006). Protective effects of *Mentha piperita* Linn on benzo[a]pyrene-induced lung carcinogenicity and mutagenicity in Swiss albino mice. *Mutagenesis*, 21 (1), pp:61-66.
- Samman, M. A.; Bowen, I. D.; Taiba, K.; Antonius, J. & Hannan, M. A. (1998). Mint prevents shamma-induced carcinogenesis in hamster cheek pouch. *Carcinogenesis*, 19 (10), pp: 1795-801.
- Santa-Maria, A.; Lopez, A.; Diaz, M.M.; Albán, J.; Galán de Mera, A.; Vicente-Orellana, J.A.; Pozuelo, J.M. (1997). Evaluation of the toxicity of *Uncaria tomentosa* by bioassays *in vitro*. *J. Ethnopharmacol.* 57 (3), pp: 183-187.
- SAS Institute Inc., SAS/STAT ® User's Guide, Cary, NC: SAS Institute Inc. (1995).
- Sato, T.; Nagaoka, K.; Nagase, H.; Niikawa, M.; Kito, H. (1996). The effect of several antipyretic analgesics on mitomycin C-induced mutagenesis using the wing spot test in *Drosophila melanogaster*. *Jpn. J. Toxicol. Environ. Heal.* 42, pp: 136-141.
- Schlatter, J.; Katz, W. K. (1990). The carcinogenic potential of ethyl carbamate (urethane): risk assessment at human dietary exposure levels. *Food Chem. Toxicol.* 28, pp: 205-211.
- Schoental, R. (1975). Pancreatic islet-cell and other tumours in rats given heliotrine, a monoester pyrrolizidine alkaloid, and nicotinamide. *Cancer Res.* 35, pp: 2020-2024.
- Seo, H-S.; Choi, H-S-; Kim, S-R.; Choi, Y.K.; Woo, S-M.; Shin, I.; Woo, J-K.; Park, S-Y.; Shin, Y.C.; Ko, S-K. (2012). Apigenin induces apoptosis via extrinsic pathway, inducing p53 and inhibiting STAT3 and NF κ B signaling in HER2-overexpressing breast cancer cells. *Mol. Cell. Biochem.* 366, pp: 319-334.
- Sheng, Y.; Bryngelsson, C.; Pero, R.W. (2000, a). Enhanced DNA repair, immune function and reduced toxicity of C-MED-100, a novel aqueous extract from *Uncaria tomentosa*. *J. Ethnopharmacol.* 69, pp: 115-126.
- Sheng, Y.; Pero, R.W.; Amiri, A.; Bryngelsson, C. (1998). Induction of apoptosis and inhibition of proliferation in human tumor cells treated with extracts of *Uncaria tomentosa*. *Anticancer Res.* 18, pp: 3363-3368.
- Sheng, Y.; Pero, R.W.; Wagner, H. (2000, b). Treatment of chemotherapy-induced leucopenia in a rat model with aqueous extract from *Uncaria tomentosa*. *Phytomedicine.* 7, pp: 137-143.
- Sies, H. (1985). Oxidative stress: introductory remarks. En: *Oxidative Stress*. Editado por Sies, H. *Academic Press*. London.
- Sies, H. (1986). Biochemistry of oxidative stress. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 25, pp: 1058-1071.



- Stich, H. F. (1991). The beneficial and hazardous effects of simple phenolic compounds. *Mutat. Res.* 259, pp: 307-24.
- Stickel, F.; Seitz, H.K.; Hahn, E.G.; Schuppan, D. (2001). Liver toxicity of drugs of plant origin. *Z. Gastroenterol.* 39 (3), pp: 225-232 y 234-237.
- Stoner, G. D. (1991). Lung tumors in strain A mice as a bioassay for carcinogenicity of environmental chemicals. *Exp. Lung Res.* 17, pp: 405-423.
- Strissel, P.L.; Strick, R. (2005). Multiple effects of Bioflavonoids on gene regulation, cell proliferation and apoptosis: Natural compounds move into the lime light of cancer research. *Leukemia Res.* 29, pp: 859-861.
- Stuppner, H.; Sturem, S.; Geisen, G.; Zillian, U.; Konwalinka, G. (1993). A differential sensitivity of oxindole alkaloids in normal and leukemic cell lines. *Planta Medica.* 59, Supplement Issue S 1 59, pp: A583.
- Suh, N.; Luyengi, L.; Fong, H.H.S.; Kinghorn, A.D.; Pezzuto, J.M. (1995). Discovery of natural product chemopreventive agents utilizing HL-60 cell differentiation as a model. *Anticancer Res.* 15 (2), pp: 233-239.
- Surh, Y.J.; Ferguson, L.R. (2003). Dietary and medicinal antimutagens and anticarcinogens: molecular mechanisms and chemopreventive potential-highlights of a symposium. *Mutat. Res./Fund. Molec. Mechan. Mutagen.* 523-524, pp: 1-8.
- Svoboda, D.J.; Reddy, J.K. (1972). Malignant tumour in rats given lasiocaprine. *Cancer Res.* 32, pp: 908-913.
- Swerdlow, J.L. (2000). Natures Medicine Plants that Heal. *National Geographic Society*, Washington.
- Tabach, R.; Rodrigues, E.; Carlini, E.A. (2009). Preclinical toxicological assesment of a phytotherapeutic product-CPV (based on dry extracts of *Crataegus oxyacantha L.*; *Passiflora incarnata L.*; and *Valeriana officinalis L.*) *Phytother. Res.* 23 (1), pp: 33-40.
- Taddei, I.; Giachetti, D.; Taddei, E.; Mantovani, P.; Bianchi, E. (1998). Spasmolytic activity of peppermint, sage and rosemary essences and their major constituents. *Fitoterapia.* 59, pp: 463-468.
- Takahashi, T.; Kobori, M.; Shinmoto, H.; Tsushida, T. (1998). Structure-activity relationships of flavonoids and the induction of granulocytic or monocytic differentiation in HL-60 human myeloid leukaemia cells. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 62, p: 2199.
- Takahashi, K.; Sekiguchi, M.; Kawazoe, Y. (1990). Effects of vanillin and o-vanillin on induction of DNA-repair networks: modulation of mutagenesis in *Escherichia coli*. *Mutat. Res.* 230, pp: 127-134.



- Tamagawa, K.; Fukushima, S.; Kobori, K.; Shinmoto H.; Tsushida, T. (1998). Proanthocyanidins from barley bran potentiate retinoic acid-induced granulocytic and sodium butyrate-induced monocytic differentiation of HL-60 cells. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 62, p: 1483.
- Tanaka, T.; Kawamori, T.; Ohnishi, M.; Okamoto, K.; Mori, H.; Hara, A. (1994). Chemoprevention of 4-Nitroquinoline 1-Oxide-induced Oral Carcinogenesis by Dietary Protocatechuic Acid during Initiation and Postinitiation Phases. *Cancer Res.* 54, pp: 2359-2365.
- Tanaka, T.; Kojima, T.; Kawamori, T.; Mori, H. (1995). Chemoprevention of digestive organs carcinogenesis by natural product protocatechuic acid. *Cancer.* 75, pp: 1433-1439.
- Tarella, C.; Ferrero, D.; Gallo, E.; Pagliardi, G.L.; Ruscetti, F.W. (1982). Induction of differentiation of hl60 cells by dimethyl sulfoxide: evidence for a stochastic model not linked to the cell division cycle. *Cancer Res.* 42, pp: 445-449.
- Tatman, D.; Mo, H. (2002). Volatile isoprenoid constituents of fruits, vegetables and herbs cumulatively suppress the proliferation of murine B16 melanoma and human HL-60 leukemia cells. *Cancer Lett.* 175, pp: 129-39.
- Teicher, B.A.; Holden, S.A.; Rudolph, M.B.; Sotomayor, E.A.; Herman, T.S. (1991). Effect of environmental conditions (pH, oxygenation and temperature) on the cytotoxicity of flavone acetic acid and its dimethylaminoethyl ester. *Int. J. Hyperthermia.* 7 (6), pp: 905-15.
- Tennant, R. W.; Ashby, J. (1991). Classification according to chemical structure, mutagenicity to *Salmonella* and level of carcinogenicity of a further 39 chemicals tested for carcinogenicity by the U.S. National Toxicology Program. *Mutat. Res.* 257, pp: 209-27.
- Teixeira, B.; Marques, A.; Ramos, C.; Batista, I.; Serrano, C.; Matos, O.; Neng, N.R.; Nogueira, J.M.F.; Saraiva, J.A.; Nunes, M.L. (2012). European pennyroyal (*Mentha pulegium*) from Portugal: Chemical composition of essential oil and antioxidant and antimicrobial properties of extracts and essential oil. *Ind. Crops Prod.* 36 (1), pp: 81-87.
- Thomas, P.R.; Earl, R. (1994). Committee on opportunities in the nutrition and food sciences. Enhancing the food supply. Opportunities in the Nutrition and Food Sciences. Research Challenges and the Next Generation of Investigators. Washington, D.C. *National Academy Press.* pp: 98-142.
- Thomassen, D.; Pearson, P.G.; Statter, J.T.; Nelson, D. (1991). Partial characterization of biliary metabolites of pulegone by tandem mass spectrometry. *Drug Metabol. Disp.* 19 (5): 997-1003.



- Thorup, I.; Würtzen, G.; Carstensen, J.; Olsen, P. (1983). Short term toxicity study in Rat dosed with peppermint oil. *Toxicol Lett.* 19, pp: 211-215.
- Timbrell, J. (2001). Principles of Biochemical Toxicology. *Taylor & Francis*. London.
- Trouillas, P.; Calliste, C-A.; Allais, D-P.; Simon, A.; Marfak, A.; Delega, C.; Duroux, J-L. (2003). Antioxidant, anti-inflammatory and antiproliferative properties of sixteen water plant extracts used in Limousin countryside as herbal teas. *Food Chemistry.* 80, pp: 399-407.
- Tsai, S.; Yin, M. (2012). Anti-glycative and anti-inflammatory effects of protocatechuic acid in brain of mice treated by D-galactose. *Food Chem. Toxicol.* 50, pp: 3198-3205.
- Tseng, T.H.; Hsu, J. D.; Lo, M. H.; Chu, C. Y.; Chou, F. P.; Huang, C. L.; Wang, C. J. (1998). Inhibitory effect of *Hibiscus* protocatechuic acid on tumor promotion in mouse skin. *Cancer Lett.*, 126, pp: 199-207.
- Tseng, T. H.; Wang, C. J.; Kao, E. S.; Chu, H. Y. (1996). Hibiscus protocatechuic acid protects against oxidative damage induced by tert-butylhydroperoxide in rat primary hepatocytes. *Chem. Biol. Interact.* 101, pp: 137-148.
- Tsiftoglou, A.S.; Pappas, I.S.; Vizirianakis, I.S. (2003). Mechanisms involved in the induced differentiation of leukemia cells. *Pharmacol. & Therapeutics* 100, pp: 257-290.
- Turner, S.; Tinwell, H.; Piegorsch, W.; Schmezer, P.; Ashby, J. (2001). The male rat carcinogens limonene and sodium saccharin are not mutagenic to male Big Blue TM rats. *Mutagenesis.* 16, pp: 329-32.
- Ueda, J. I.; Saito, N.; Shimazu, Y.; Ozawa, T. (1996). A Comparison of Scavenging Abilities of Antioxidants against Hydroxyl Radicals. *Arch. Biochem. Biophys.* 333, pp: 377-384.
- Uedo, N.; Tatsuta, M.; Iishi, H.; Baba, M.; Sakai, N.; Yano, H.; Otani, T. (1999). Inhibition by D-limonene of gastric carcinogenesis induced by N-methyl-N²-nitro-N-nitrosoguanidine in Wistar rats. *Cancer Letters.* 137 (2), pp: 131-136.
- Ujiki, M. B.; Ding, X. Z.; Salabat, M. R.; Bentrem, D. J.; Golkar, L.; Milam, B.; Talamonti, M. S.; Bell, R. H.; Iwamura, T.; Adrian, T. E. (2006). Apigenin inhibits pancreatic cancer cell proliferation through G2/M cell cycle arrest. *Mol. Cancer.* 5, p: 76.
- Valerio, L.G.; Gonzales, G.F. (2005). Toxicological aspects of the South American herbs Cat's Claw (*Uncaria tomentosa*) and Maca (*Lepidium meyenii*). *Toxicol. Rev.*, 24, pp. 11-35.
- van Acker, S.A.B.E.; De Groot, M.J.; Van den Berg, D.J.; Tromp, M.N.J.L.; Den Kelder, G.D.O.; Van der Vijgh, W.J.F., et al. (1996). A quantum chemical explanation of the antioxidant activity of flavonoids. *Chem. Res. Toxicol.* 9, pp: 1305-1312.
- van Poppel, G.; Goldbohm, R.A. (1995). Epidemiologic evidence for β -carotene and cancer prevention. *Am. J. Clin. Nutr.* 62, pp: 1393 S- 1402 S.



- Verhoeven, D.T.; Goldbohm, R.A.; van Poppel, G; Verhagen, H; van der Brandt, P.A. (1996). Epidemiological studies on *brassica* vegetables and cancer risk. *Cancer Epidem. Biomar. Prev.* 5, pp: 733-748.
- Verlinden, L.; Verstuyf, A.; Mathieu, C.; Tan, B.K.; Bouillon, R. (1998). Differentiation induction of HL60 cells by 1,25(OH)₂D₃, all trans retinoic acid, rTGF-β₂ and their combinations. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 60, pp: 87-97.
- Villatoro-Pulido, M.; Font, R.; De Haro-Bravo, M.I.; Romero-Jiménez, M.; Anter, J.; De Haro-Bailón, A.; Alonso-Moraga, A.; Del Río-Celestino, M. (2009). Modulation of genotoxicity and cytotoxicity by radish grown in metal-contaminated soils. *Mutagenesis.* 24 (1), pp: 51-7.
- Vogel, E. W. (1992). Tests for recombinagens in somatic cells of *Drosophila*. *Mutat. Res.* 284, pp: 159-175.
- Vuković-Gačić, B.; Nikčević, S.; Berić-Bjedov, T.; Knežević-Vukčević, J.; Simić, D. (2006). Antimutagenic effect of essential oil of sage (*Salvia Officinalis* L.) and its monoterpenes against UV-induced mutations in *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Chem. Toxicol.* 44 (10), pp: 1730-1738.
- Wagner, C.; Kreutzkamp, B.; Jurcic, K. (1985). The alkaloids of *Uncaria tomentosa* and their phagocytosis-stimulating action. *Planta Medica.* 11, pp: 419-423.
- Wang, I. K.; Lin-Shiau, S. Y.; Lin, J. K. (1999) Induction of apoptosis by apigenin and related flavonoids through cytochrome c release and activation of caspase-9 and caspase-3 in leukaemia HL-60 cells. *Eur.J. Cancer.* 35, pp: 1517-1525.
- Watabe, T.; Hiratsuka, A.; Isobe, M.; Ozawa, N. (1980). Metabolism of d-limonene by hepatic microsomes to nonmutagenic epoxides toward *Salmonella typhimurium*. *B&Hem. Pharmacol.* 29, pp: 1068-1071.
- Watabe, T.; Hiratsuka, A.; Ozawa, N.; Isobe, M. (1981). A comparative study on the metabolism of d-limonene and 4-vinylcyclohex-1-ene by hepatic microsomes. *Xenobiotica.* 11, pp: 333-334.
- Watanabe, K.; Ohta, T.; Watanabe, M.; Kato, T.; Shirasu, Y. (1990). Inhibition of induction of adaptative response by *o-vanillin* in *Escherichia coli* B. *Mutation Res.*, 243, pp: 273-280.
- Wattenberg, L.W.; Coccia, J.B. (1991). Inhibition of 4-(methylnitrosamino)-1-(-3-pyridyl)-1-butanone carcinogenesis in mice by D-limonene and citrus fruit oils. *Carcinogenesis.* 12, pp: 115-117.
- Winquist, R.J.; Boucher, D.M.; Wood, M.; Furey, B.F. (2009). Targeting cancer stem cells for more effective therapies: Taking out cancer's locomotive engine. *Biochem. Pharmacol.* 78, pp: 326-334.



- Winston, G. W.; Di Giulio, R.T. (1991). Prooxidant and antioxidant mechanisms in aquatic organisms. *Aquat. Toxicol.* 19, pp: 137-161.
- Wiedenfeld, H.; Edgar, J. (2011). Toxicity of pyrrolizidine alkaloids to humans and ruminants. *Phytochem. Rev.* 10, pp: 137-151.
- Witt, O.; Sand, K.; Pekrum, A. (2000). Butyrate-induced erythroid differentiation of human K562 leukemia cells involves inhibition of ERK and activation of p38 MAP kinase pathways. *Blood.* 95, pp: 2391-2396.
- Wolf, D.; Rotter, A. (1985). Major deletions in the gene encoding the p53 tumor antigen cause lack of p53 expression in HL-60 cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 82, pp: 790-794.
- Wügler, F. E.; Vogel, E. W. (1986). *In vivo* mutagenicity testing using somatic cells of *Drosophila*. En: *Chemical mutagens. Principles and methods for their detection*. Vol 10. Editado por F. J. de Serres. Plenum Press. New York.
- Yan, J.; Huen, D.; Morely, T.; Johnson, G.; Gubb, D.; Roote, J.; Adler, P.N. (2008). The multiple-wing-hairs gene encodes a novel GBD-FH3 domain-containing protein that functions both prior to and after wing hair initiation. *Genetics.* 180 (1), pp: 219-28.
- Yan, F.G.; Wang, M.; Li, J.M.; Cheng, H.; Su, J.J.; Wang, X.S.; Wu, H.Y.; Xia, L.Z.; Li, X.X.; Chang, H.C.; Li, Q.L. (2012). Gambogic acid induced mitochondrial-dependent apoptosis and referred to Phospho-Erk 1/ 2 and Phospho-p38 MAPK in human hepatoma HepG2 cells. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 33, pp: 181-190.
- Yen, A.; Brown, D.; Fishbaugh, J. (1987). Control of hl60 monocytic differentiation, different pathways and uncoupled expression of differentiation markers. *Exp. Cell Res.* 168, pp: 247-254.
- Yen, G. Cb.; Hsieh, C.L. (2000). Reactive Oxygen Species Scavenging Activity of Du-zhong (*Eucommia ulmoides Oliv.*) and Its Active Compounds. *J. Agric. Food Chem.* 48, pp: 3431-3436.
- Yildirim, A.; Mavi, A.; Oktay, M.; Kara, A.A.; Algur, O.F.; Bilaloglu, V. (2000). Comparison of antioxidant and antimicrobial activities of tilia (*Tilia argentea Desf ex D.C.*), sage (*Salvia Triloba I.*), and black tea (*Camellia sinensis*) extracts. *J. Agric. Food Chem.* 48 (10), pp: 530-5034.
- Yoshino, M.; Murakami, K. (1998). Interaction of Iron with Polyphenolic Compounds: Application to Antioxidant Characterization. *Anal. Biochem.* 257, pp: 40-44.
- Zhang, H.N.; An, C.N.; Zhang, H.N.; Pu, X.P. (2010). Protocatechuic acid inhibits neurotoxicity induced by MPTP in vivo. *Neurosci. Lett.* 474, pp: 99-103.
- Zhou, S.; Koh, H-L.; Gao, Y.; Gong, Z-Y.; Lee, E.J.D. (2004). Herbal bioactivation: The good, the bad and the ugly. *Life Sciences.* 74, pp: 935-968.



- Zimmering, S.; Olvera, O.; Hernández, M.E.; Cruces, M.P.; Arceo, C.; Pimentel, E. (1990). Evidence for a radioprotective effect of chlorophyllin in *Drosophila*. *Mutat. Res.* 245, pp: 47-49.
- Zordan, M.; Graf, U.; Singer, D.; Beltrame, C.; Dalla Valle, L.; Osti, M.; Costa, R.; Levis, A. G. (1991) The genotoxicity of nitrilotriacetic acid (NTA) in a somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Mutat. Res.* 262, pp: 253-261.





UNIVERSIDAD
DE
CÓRDOBA

