

Tlaxcala, Tlax.

Diciembre, 2008

Dra. Edelmira García Nieto  
Dra. Adriana Montoya Esquivel

Co-directoras de tesis

Bióloga Claudia Méndez Espinoza

P r e s e n t a

Maestra en Ciencias Biológicas

para obtener el grado de

T e s i s

en cultivos de linfocitos humanos

*Cantharellus cf. cibarius*

de extractos acuosos de

Evaluación del potencial antígenotóxico

División de Ciencias Biológicas

Universidad Autónoma de Tlaxcala



Tlaxcala, Tlax.

Diciembre, 2008

Comité Tutorial  
Dra. Adriana Montoya Esquivel  
Dra. Edelmira García Nieto  
Dra. María Carmen Calderón Ezquerro  
Dra. Alba Mónica Montiel González

Bióloga Claudia Méndez Espinoza

P r e s e n t a

Tesis  
para obtener el grado de  
Maestra en Ciencias Biológicas

Evaluación del potencial antigénico  
de extractos acuosos de  
*Cantharellus cf. cibarius*  
en cultivos de linfocitos humanos

Universidad Autónoma de Tlaxcala  
División de Ciencias Biológicas



Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Toxicología Ambiental del Centro de Investigación en Genética y Ambiente de la Universidad Autónoma de Tlaxcala, bajo la codirección de las Dras. Adriana Montoya Esquivel y Edelmira García Nieto así como en el Centro de Ciencias de la Atmósfera de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la asesoría de la Dra. Carmen Calderón Ezquerro. Para la realización de los estudios de maestría en el Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta de la Universidad Autónoma de Tlaxcala se contó con una beca otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología con número de registro 209308 en la convocatoria Nacional septiembre 2006. La Maestría en Ciencias Biológicas está actualmente registrada en el Padrón Nacional de Posgrado.

COORDINACIÓN DE LA MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS  
CENTRO TLAXCALA DE BIOLOGÍA DE LA CONDUCTA  
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE TLAXCALA  
PRESENTE

Los abajo firmantes, miembros del jurado evaluador del proyecto de tesis que la Biol. Agrop. Claudia Méndez Espinoza realiza para la obtención del grado de Maestra en Ciencias Biológicas, expresamos que, habiendo revisado la versión final del documento de tesis, damos la aprobación para que ésta sea impresa y defendida en el examen correspondiente. El título que llevará es "Evaluación del potencial antigenotóxico de *Cantharellus cf cibarius* en cultivos de linfocitos humanos".

Sin otro particular, aprovechamos para enviarle un cordial saludo.

Atentamente

Tlaxcala, Tlax., a 2 de Diciembre de 2008

Adriana Montoya E.  
Dra. Adriana Montoya Esquivel



Dra. María Carmen Calderón Ezquerro



Dra. Alba Mónica Montiel González



Dra. Edelmira García Nieto



Sandra Gómez Arroyo  
Dra. Sandra Gómez Arroyo

Dra. María Mercedes Rodríguez Palma



## DEDICATORIA

A los amores de mi vida

Mis padres, Adela Espinoza Mendoza y César Méndez Sánchez por darme el mayor ejemplo de nobleza, honestidad, dedicación, y sacrificio, por alejarse de sus sueños para permitirnos alcanzar los nuestros, son la luz más brillante en mi universo, gracias por confiar en mí y perdonar mis fallas, por darme libertad. Toda mi admiración es para ustedes.

A mis hermanos, por la dicha de crecer a su lado

Angélica, por ser tan hermosa y soportar mi historia, envidio tu fortaleza para enfrentar las dificultades con dignidad. Quisiera tener un poco de la nobleza que te sobra.

Roberto, por cuidar de nosotros en tiempos difíciles, por tu apoyo constante. Te quiero mucho.

A mi niño

Angel Rafael, por ser tan especial, por llenarme de ilusiones y esperanza. Te adoro con locura.

## AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, a quienes fueron las guías de este trabajo, por su paciencia casi interminable y por apoyarme mucho más de lo que esperaba. Pero también por las horas de angustia y sufrimiento que me dieron y que me han ayudado a crecer. Les guardo especial cariño.

Dra. Adriana Montoya Esquivel, por su cariño y personalidad tan peculiares. Por ser directora de esta tesis (aun en contra de su voluntad) por sus regalos y por defenderme siempre. Por permitirme ser su alumna y amiga.

Dra. Carmen Calderón Ezquerro, por aceptarme en su laboratorio y abrirme la puerta a los caprichosos micronúcleos. Por su sencillez y preocupación por mi bienestar en una ciudad extraña.

Dra. Edelmira García Nieto, porque en ningún momento dejó de emocionarse junto a mi con este trabajo.

Dra. Alba Mónica Montiel González, por sus observaciones y apoyo para hacerme comprender partes esenciales de este trabajo.

Dr. Arturo Estrada Torres, por brindarme parte de su tiempo. Deje de despreciarme y mejor quíetame, al menos un poco.

M C. Alejandro Kong Luz, por permitirme convivir y aprender de usted.

M C. Libertad Juárez Santacruz, por su confianza y amistad invaluable.

A los maestros que finalmente me aceptaron, espero... Dra. Guadalupe Santiago Martínez, MC Gema Galindo Flores, MC Verónica Hernández Cuevas y Dra. Mercedes Rodríguez Palma.

Mis queridos amigos  
Rodrigo Flores Rivera, mi mayor amigo. Por tu paciencia y cariño inmerecido. Por cuidarme siempre, pero sobre todo por lo que hemos crecido juntos.

Mis compañeros de generación, mis chicas favoritas: Brenda Saenité López Solano y Aline Velasco Ramírez, por las incontables carcajadas y sueños compartidos, son geniales. Las extraño. Fernando Aguilar Montiel, por quererme y hacerme sentir importante. Leticia Gómez Rosas y Vanesa Martínez.

Marisol García Sastre, por permitirme ser tu amiga después de detestarnos tanto. Por tus consejos y por escucharme siempre. Me haces mucha falta.

Dulce María Tapia Cruz, por enseñarme a vivir en Dfpolis y siempre estar dispuesta a ayudarme.

Mis nuevos amigos, de quienes espero ser compañera durante mucho, mucho tiempo  
Dra Cecilia Nieto de Pascual Pola, por brindarme su apoyo, cariño y confianza. Por su  
tranquieza, sus ánimos y por defenderme constantemente.

Biol. Marisela Zamora Martínez, por su calidez, apoyo y confianza en mí.

Dr. Carlos Castillo Martínez, por nuestras peleas, berrinches y los proyectos futuros.

Dr. Fabian Islas Gutiérrez, cuyo apoyo permitió la culminación de esta tesis.

A la vida por bendecirme siempre...

# INDICE

Pág.	1	1.1 Las alteraciones genéticas y el mecanismo de producción de daño
1	1	1.1.1 Alteraciones espontáneas
4	4	1.1.2 Alteraciones inducidas
6	6	1.1.3 Relevancia de los agentes alquilantes. Mecanismo de inducción de daño al ADN por metil metanosulfonato (MMS)
8	8	2. ANTECEDENTES
8	8	2.1 Ensayos de detección de antimutágenos
9	9	2.2 Electroforesis unicelular en gel (ensayo Cometa)
10	10	2.3 Miconúcleos por bloqueo de citocinesis
11	11	2.4 Linfocitos de sangre periférica como sistema de prueba
14	14	2.5 Mecanismos de antimutagenicidad
15	15	2.6 Hongos silvestres comestibles, el caso de <i>Cantharellus</i> cf. <i>cibarius</i>
20	20	2.7 Estudios sobre antigenotoxicidad fúngica
28	28	3. JUSTIFICACIÓN
28	28	4. PLANTAMIENTO DEL PROBLEMA
29	29	5. HIPÓTESIS
29	29	6. OBJETIVOS
29	29	6.1 Objetivo general
29	29	6.2 Objetivos específicos
29	29	7. METODOLOGÍA
29	29	7.1 Fase de campo
29	29	7.2 Fase de gabinete
30	30	7.3 Preparación de extractos acuosos
30	30	7.4 Criterios de selección de donadores de sangre
30	30	7.5 Fase de laboratorio
30	30	7.5.1 Etapa exploratoria del ensayo de electroforesis



unicelular en gel	31
7.5.2 Etapa experimental	31
7.5.2.1 Aislamiento de linfocitos de sangre periférica	31
7.5.2.2 Protocolos de tratamiento	32
7.5.2.3 Electroforesis unicelular en gel	33
7.5.3 Micronúcleos por bloqueo de citocinesis	34
<b>8. RESULTADOS</b>	36
8.1 Electroforesis unicelular en gel (ensayo cometa)	36
8.1.1 Porcentaje de viabilidad celular	37
8.1.2 Porcentaje de daño al ADN celular	39
8.1.3 Longitud caudal ( $\mu\text{m}$ ) de cometas por protocolo de	41
tratamiento	
8.1.4 Porcentaje de reducción de daño al ADN celular	43
8.1.5 Longitud caudal de cometas por protocolo de	45
tratamiento por individuo	
8.1.6 Micronúcleos por bloqueo de citocinesis	50
<b>9. DISCUSIÓN</b>	55
<b>10. CONSIDERACIONES FINALES</b>	61
<b>11. PERSPECTIVAS</b>	62
<b>12. REFERENCIAS</b>	63

## RESUMEN

Debido a los procesos metabólicos normales del organismo, el moderno estilo de vida, el crecimiento de la actividad industrial y agrícola, entre otros factores, nos exponemos constantemente a una vasta cantidad de mutágenos. Para evaluar el impacto de estos sobre el genoma humano se han desarrollado diversos sistemas de prueba así como de biomarcadores de daño genético. Recientemente se propuso su utilidad para determinar el efecto de diversos tipos de productos alimenticios como inhibidores o reparadores de tales alteraciones. Entre éstos sobresale el uso de hongos silvestres debido a la importancia nutritiva, cultural, medicinal y ecológica que poseen. Por lo tanto, se evaluó el potencial antigénotoxicológico de *Cantharellus* cf. *cibarius*, una especie comestible del Parque Nacional La Malinche, Tlaxcala, mediante los ensayos citogénéticos de electroforesis unicelular en gel y micronúcleos por bloqueo de citocinesis, con el uso de cultivos de linfocitos humanos como sistema de prueba. Los análisis estadísticos aplicados no permitieron detectar diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos debido a las características genómicas del tipo celular analizado y la evidente variabilidad de respuesta a daño por agentes alquilantes directos, en este caso metil metanosulfonato. Sugiriendo la posibilidad de reconsiderar el uso de sistemas de prueba altamente heterogéneos.

## 1. INTRODUCCIÓN

El material genético constituye la base de la existencia y funcionamiento de los organismos, por lo tanto, las alteraciones en su estructura comprometen la calidad de vida e incluso la supervivencia. El moderno estilo de vida, el crecimiento de la actividad industrial y agrícola, entre otros factores, exponen constantemente a los seres humanos a una vasta cantidad de mutágenos. Estos pueden interactuar en diversas formas con el organismo humano y en consecuencia constituyen un riesgo para la salud. Sin embargo, se sabe que el daño genético puede también ocurrir espontáneamente bajo condiciones metabólicas normales y puede incrementarse en situaciones de deficiencia dietaria y exposición a mutágenos y carcinógenos ambientales.

La deficiencia de micronutrientes específicos influye en la tasa de mutación en las células por virtud de su papel como antioxidantes, cofactores en el metabolismo del ADN o como intermediarios importantes en la síntesis de nucleótidos requeridos para la reparación y replicación del ADN (Fenech y cols. 1997), así como en la apoptosis e incluso la activación y desintoxicación de carcinógenos (Kaya 2003). Además, varios estudios epidemiológicos y experimentales indican que las dietas ricas en micronutrientes antioxidantes pueden reducir el riesgo de mutaciones (Kaya 2003). Por lo tanto, se considera que la dieta puede representar un factor clave en la determinación de la estabilidad genómica. En este sentido, sobresale el consumo de hongos comestibles debido a su composición química variada, que además de proporcionar beneficios nutritivos proveen de ciertas sustancias con potencial medicinal y genoprotector, aspecto que constituye la base de este trabajo.

### 1.1 Las alteraciones genéticas y el mecanismo de producción de daño

La genotoxicidad se refiere a la capacidad de una sustancia para alterar y/o dañar el ADN de una célula. Estas alteraciones se han asociado con el desarrollo de varios tipos de enfermedades (Kent 1998). Las alteraciones o cambios en el ADN se conocen bajo el término *mutación*. Los mecanismos de producción de alteraciones en el ADN pueden clasificarse de manera general en *espontáneos e inducidos*.

#### 1.1.1 Alteraciones espontáneas. Ocurren en ausencia de un tratamiento con

mutágenos, por lo tanto representan la tasa basal de mutación y presumiblemente son la



fuerza natural de la variación genética de las poblaciones debido a errores ocurridos a escala molecular, así como por acción del ambiente sobre el ADN. Entre los orígenes de este tipo de cambios genéticos se encuentran:

- *Errores durante la replicación del ADN.* El apareamiento erróneo durante el proceso de replicación del ADN es fuente de sustituciones espontáneas de bases, la mayoría de éstas es del tipo de las transiciones (Rice-Evans y cols. 1991).

- *Daño oxidante.* Los radicales libres son esenciales en diversos procesos biológicos. Se involucran en la acción de las lípo- y ciclo-oxigenasas en el metabolismo, son intermediarios y/o productos de reacciones catabolizadas por enzimas, forman parte de la respuesta tisular durante la invasión por microorganismos y también actúan como reguladores de procesos bioquímicos. Sin embargo, los radicales libres son altamente destructivos de células y tejidos si su producción resulta incontrolada (Rice-Evans y cols. 1991).

- *La toxicidad del oxígeno.* Se relaciona con su alta afinidad por electrones, produciendo una variedad de intermediarios potencialmente dañinos como el superóxido, peróxido de hidrógeno, radicales hidroxilo y peróxido así como de oxígeno singlet. El superóxido se forma *in vivo* durante la actividad mitocondrial, fagocitosis por neutrófilos, metabolismo de células endoteliales, macrófagos y fibroblastos (Rice-Evans y cols. 1991).

#### *-Daño al ADN por hidrólisis*

**Despurinación.** El azúcar ribosa tiene un grupo hidroxilo en la posición 2', ya que éste interactúa con el grupo fosfato vecino, los enlaces fosfodiéster de las moléculas de ARN son muy susceptibles de hidrolizarse. Como el ADN no posee un grupo hidroxilo en tal posición, los enlaces fosfodiéster de las moléculas de ADN son estables. Sin embargo, la falta de un grupo hidroxilo provoca el debilitamiento del enlace N-glicosídico y en consecuencia el ADN libera sus bases nitrogenadas con mayor facilidad. Las purinas guanina y adenina son más lábiles que la pirimidinas citosina y timina, la pérdida de purinas se denomina *despurinación*. Se ha estimado que la frecuencia de este tipo de daño es de al menos 2000 bases por día en cada célula humana. Un cuerpo humano consiste de  $6 \times 10^{13}$  células, por lo tanto ocurren  $1.2 \times 10^{17}$  despurinaciones diariamente. Si todos estos sitios dañados son convertidos a longitud, constituyen



aproximadamente  $4 \times 10^7$  m, una medida equivalente a la circunferencia de la Tierra (Suzuki 2006).

**Desaminación.** Los grupos amino de las bases nitrogenadas también son susceptibles de hidrólisis, la guanina, adenina y citosina son convertidas en xantina, hipoxantina y uracilo, respectivamente. Se ha estimado que la desaminación ocurre entre 100-500 ocasiones por día en una célula humana, si los sitios desaminados fueran convertidos en longitud esto representaría al menos 2000 Km (Suzuki 2006).

**- Daño al ADN por óxido nítrico (NO).** El óxido nítrico es sintetizado en varios tipos celulares, esta involucrado en numerosas funciones biológicas incluyendo la vasodilatación, neurotransmisión e inflamación. En particular, una alta concentración de óxido nítrico se genera en los macrófagos para eliminar microorganismos invasores, su reactividad *per se* es relativamente baja, sin embargo, en presencia de  $O_2$  es convertido en un agente nitrosante reactivo, el trióxido de dinitrógeno ( $N_2O_3$ ). El  $N_2O_3$  puede reaccionar con los grupos amino de varias moléculas biológicas resultando en desaminaciones y compuestos N-nitrosos, muchos de los cuales son mutagénicos y carcinogénicos, ya que actúan como agentes alquilantes formando aductos con el ADN (Suzuki 2006).

**- Daño al ADN por ácido hipocloroso (HOCl).** La mayor proporción de leucocitos esta representada por los neutrófilos y su enzima más abundante es la mieloperoxidasa, esta genera ácido hipocloroso como producto endógeno del peróxido de hidrógeno y del ion  $Cl^-$  para eliminar bacterias. Sin embargo, el HOCl formado también tiene el potencial de dañar tejidos del hospedero y contribuir en el proceso inflamatorio, además puede reaccionar con las bases nitrogenadas resultando en la formación de varios compuestos derivados de N-cloramidas como 8-cloroadenina, 5-clorocitosina y 8-cloroguanina, entre otros (Suzuki *et al.*, 2006).

**- Daño al ADN por compuestos electrofilicos dentro de la dieta.** Muchos compuestos contenidos en la dieta son electrofilicos, por lo tanto son capaces de reaccionar con el ADN. Se forman directamente o son metabolizados, por ejemplo: *aminas aromáticas heterocíclicas* IQ y PHP que han sido identificadas en la carne cocinada, pescado, pollo y productos de granos, en cantidades dependientes del tiempo y temperatura de preparación. *Compuestos N-nitrosos* que pueden producirse de forma endógena y de los cuales se han encontrado precursores en la cerveza, chile, productos de fermentación de soya, diversos vegetales y varios tipos de alimentos cocinados. Otros

compuestos como la aflatoxina B1 contenida en productos de grano contaminados y productos de combustión como el benzo(a)pireno. Los taninos de algunas dicotiledóneas pueden concentrarse como precipitados en el té, café y vino tinto, se ha encontrado que algunos de estos polifenoles causan daño cromosómico (Ferguson 1994).

**1.1.2 Alteraciones inducidas.** Son aquellas que se producen directa o indirectamente por intervención humana. El hombre realiza tratamientos experimentales con el propósito claro y definido de inducir mutaciones en los seres vivos con fines de interés científico. Sin embargo, en ocasiones, la mutagénesis se induce por la acción de agentes físicos o químicos producidos y utilizados por la nueva tecnología (Moreno y cols. 2002). Esto puede dar lugar a la inducción de transformaciones neoplásicas en las células ya sea por mecanismos *genotóxicos* o *no genotóxicos (epigenéticos)*. Algunos ejemplos de daños inducidos al material genético se muestran en la Figura 1.

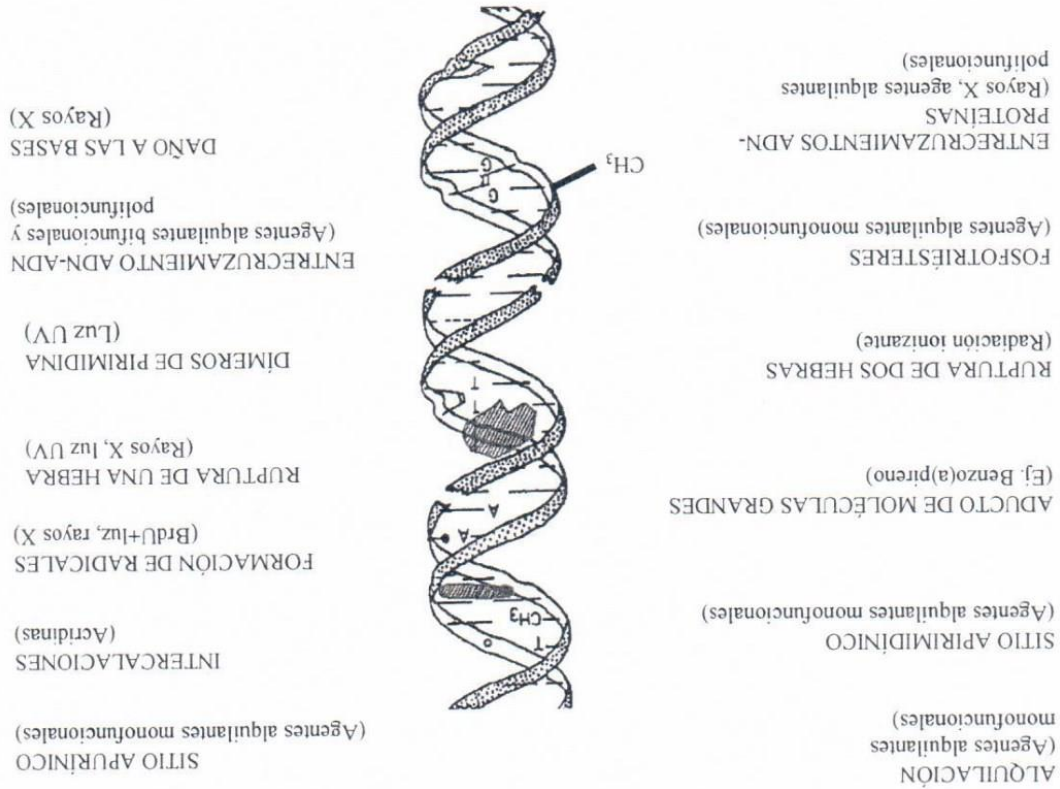


Figura 1. Tipos de daño inducido al ADN por agentes físicos y químicos.



### Agentes físicos

*-Radiaciones ionizantes.* Radiaciones tales como los rayos X, gama y alfa producen rupturas simples y dobles en el ADN y un amplio intervalo de daños en las bases (Preston y Hoffmann 2001).

*-Luz ultravioleta.* Esta es del tipo de radiaciones no ionizantes, induce dos clases predominantes de lesiones, dímeros de ciclobutano pirimidinas y 6:4 fotoproductos que interfieren con el emparejamiento normal, promueven la transición de la pirimidina citosina por timina, pero también pueden ocasionar transversiones, duplicaciones y deleciones de mayor tamaño (Griffiths 1998).

### Agentes químicos

*-Agentes alquilantes.* Los compuestos químicos pueden alterar directamente las bases formando aductos o indirectamente al intercalar un agente químico entre los pares de bases. Algunas bases alquiladas pueden aparearse erróneamente, causando mutaciones cuando el ADN se replica (Griffiths 1998).

*-Agentes intercalantes.* Son moléculas planas que simulan pares de bases y son capaces de intercalarse entre las bases nitrogenadas del centro de la doble hélice. Cuando ocupan esta posición provocan inserciones o deleciones de un par de nucleótidos. Los agentes intercalantes también pueden colocarse entre las bases del ADN de cadena sencilla; de este modo estabilizan las bases desapareadas durante la formación de un desfase por deslizamiento de la polimerasa (Griffiths 1998).

En investigaciones sobre antigénotoxicidad, como en el caso del presente trabajo, a menudo se utilizan los agentes alquilantes como inductores de daño genético, pues el estudio de la respuesta celular a la metilación del ADN ha contribuido significativamente al entendimiento de la función celular. La mutagenicidad de los agentes metilantes, tales como el metilmetanosulfonato (MMS) y 1-metil-1-nitrosourea (MNU) es ampliamente apreciada y útil para causar mutaciones en bacterias y células humanas. Aunado a las contribuciones para comprender diversas funciones celulares, han representado puntos clave para conocer los procesos de reparación del ADN y carcinogénesis.

La posición N7 de la guanina es el sitio más nucleofílico del ADN y su ubicación accesible la convierte en el principal sustrato de los agentes metilantes con una débil como un número menor de modificaciones en las bases (Beranek 1990).

Relativamente subgrupos pequeños de la población humana sufren exposición laboral limitada a agentes metilantes de genotoxicidad débil como el dimetil sulfato y metilbromuro. De mayor significancia para la salud pública es la exposición de la población en general a agentes metilantes altamente carcinogénicos como NDMA<sup>1</sup> y NNK<sup>2</sup>. Estas nitrosaminas están presentes en cantidades considerables en el humo del tabaco, mientras que NDMA también se encuentra en alimentos tratados con nitratos y en ciertas bebidas (Kyrtopoulos 1998). Además, parte de la exposición humana a NDMA se deriva de su formación endógena en el estómago y otras partes del cuerpo (Kyrtopoulos 1998). NDMA y NNK son agentes metilantes que generan principalmente N<sup>7</sup>-metilguanina (N<sup>7</sup>-meG, ~70% de todos los aductos formados), O<sup>6</sup>-metilguanina (O<sup>6</sup>-meG, ~7%), N<sup>3</sup>-metiladenina (~3%), O<sup>4</sup>-metil-timina (<0.1%), metilfosforotriésteres (~12%) así

tanto, todos los organismos experimentan y responden a este tipo de alteración (Pieper 1998). ocurre por un mecanismo no enzimático que involucra la S-adenosil-L-metionina. Por lo tanto, todos los organismos experimentan y responden a este tipo de alteración (Pieper 1998). como subproductos de diversos procesos industriales. La metilación endógena también entre los organismos debido a que los agentes alquilantes están presentes en el ambiente asociados (Beranek 1990). El daño por metilación del ADN ocurre de forma extensa alquilantes son de interés, en vista de la exposición humana a ellos y los riesgos genéticos Aunado a su amplio uso en la toxicología genética experimental, los agentes manipular este proceso (Pieper 1998).

Los agentes alquilantes han sido reconocidos como carcinógenos y fue precisamente con éstos que la relación entre carcinogenicidad y daño al ADN fue demostrada con mayor claridad. El estudio subsecuente de la reparación del ADN metilado ha permitido el aislamiento de las proteínas involucradas en éste, así como la identificación de síndromes cancerosos y cáncer esporádico caracterizado por la restauración ineficiente del ADN, asimismo ha guiado hacia el diseño de estrategias quimioterapéuticas con el fin de

## 1.2 Relevancia de los agentes alquilantes. Mecanismo de inducción de daño al ADN por metil metanosulfonato (MMS)



El daño por alquilación del ADN es reparado básicamente por dos procesos: 1) la transferencia directa del grupo alquilo a la proteína reparadora o 2) la remoción de la base modificada por una glucosilasa, dejando un sitioapurínico o apirimidínico que es entonces sustrato del proceso de escisión. Este se involucra en la reparación de aductos que distorsionan la hélice del ADN y ha sido identificado como mecanismo de refuerzo en la reparación de lesiones normalmente restauradas por alquiltransferasas o glucosilasas. La actividad de las alquil transferasas consiste en un mecanismo libre de errores ya que sólo el grupo alquilo es removido del ADN. En caso de la reparación por

partir de dietilamina y metilnitrito en el humo de tabaco (Beranek 1990).  
 generarse en el cuerpo por acción de agentes nitrosantes en aminas ingeridas o formarse a DMN se encuentran en cantidades traza en muchos productos alimenticios y pueden los dialquil sulfatos como agentes para desarrollar nuevas variedades de plantas. DEN y química. MNU, ENU y MNNG para generar compuestos diazo. MNU y ENU junto con estos compuestos han sido empleados como agentes alquilantes hidrosolubles en síntesis para utilizarse como anticonceptivos masculinos (Jackson 1964). De forma más reciente, quimioesterilizantes de plagas de insectos y mamíferos e incluso fueron considerados inicialmente los alquil alcanosulfonatos fueron sintetizados para su uso como (DMN) y dietil nitrosaminas (DEN).

1. Alquil sulfatos, dietil (DES) y dimetil sulfato (DMS),
2. Alquil alcanosulfonatos, metil (MMS) y etil metanosulfonato (EMS) y
3. Nitrosamidas, metil (MNU) y etil nitrosourea (ENU), metil (MNNG) y etil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina (ENNG) y las nitrosaminas de acción indirecta dimetil

Los agentes metilantes o alquilantes se dividen en tres grupos:

mutagenicidad (Kyrtopoulos 1998).  
 acumularse a niveles que ocasionen efectos biológicos significativos a pesar de su baja vida media de 55-60 horas), lo cual significa que durante una exposición continua puede mayoría de los tejidos (por ejemplo, en hígado de rata o linfocitos humanos tiene una ADN *in vitro* (Pieper 1998). Además, esta alteración es reparada lentamente en la constituye mutaciones (Preston y Hoffmann 2001) y se sabe que inhiben la replicación de apurínicos (sitios AP) (Kyrtopoulos 1998), la inserción de bases incorrectas en éstos deterioro experimental despurinación enzimática o espontánea para formar sitios atracción electrofónica (Pieper 1998), por compuestos como DMS y MMS. Este tipo de

Los resultados de las pruebas de antimutagenicidad son considerablemente más complejos que aquellos de pruebas de mutagenicidad debido a una variable adicional, la actividad del antimutágeno (Brockman y cols. 1992). Entre los ensayos empleados para la identificación de agentes antimutagénicos se encuentran el de electroforesis unicelular en gel y micronúcleos por bloqueo de citocinesis, ambos relativamente recientes y de gran sensibilidad, los cuales se emplearán en este trabajo

tratamientos con mutágenos (Kuroda y cols. 1992). Y post-tratamiento con el antimutágeno por varios periodos antes y después de los pueden usarse más de dos compuestos, un mutágeno y un antimutágeno, pre-tratamiento fragmentación de ADN, etc. Aunado a lo anterior, en los cultivos celulares de mamíferos cromosómicas, intercambios de cromátidas hermanas, síntesis no programada de ADN, pruebas microbianas puede detectarse como mutaciones génicas, aberraciones corto plazo. En éstos, la mutagenicidad de algunos carcinógenos que son negativos en importantes en la detección de mutágenos ambientales y antimutágenos en pruebas a Con este fin, los sistemas de cultivo de células de mamíferos tienen varios usos (Brockman y cols. 1992).

empleados para la identificación de posibles antimutágenos y anticarcinógenos mutágenos y carcinógenos potenciales en el ambiente. Los mismos procedimientos son corto plazo de mutagenicidad han sido utilizados de forma efectiva para identificar mutágenos también podrían ser efectivas para identificar antimutágenos. Los ensayos de los mismos tipos de pruebas de corto plazo que habían sido útiles en la detección de mutación fueron realizadas por Clarke y Shankel. En la década de los 70 se sugirió que Las primeras investigaciones sobre la detección de antimutágenos utilizando pruebas de

## 2.1 Ensayos de detección de antimutágenos

### 2. ANTECEDENTES

glucosilasas, el nucleótido modificado completo es eliminado y el sitio apurínico o apirimidínico se escisa y repara utilizando la hebra opuesta como molde. Ya que este tipo de reparación depende de sintetizar una réplica a partir de la hebra escisada, los errores pueden surgir a partir del mal apareamiento de nucleótidos a los moldes o por la incorporación errónea de los nucleótidos durante la síntesis (Beranek 1990).



## 2.2 Electroforesis unicelular en gel (ensayo cometa)

El concepto de electroforesis en microgel fue introducido en 1984 por Ostling y Johanson (Olive y Banath 2006) como un método para medir rupturas simples causantes de la relajación del superenrollamiento del ADN. Una versión modificada fue publicada por Singh (1988) que emplea condiciones alcalinas y se retoma en la presente investigación debido a las ventajas que más adelante se abordan. La corriente eléctrica ocasiona que los fragmentos de ADN cargado negativamente migren a lo largo de la preparación de acuerdo con su tamaño en dirección opuesta al núcleo, donde se considera que la distancia recorrida está en función de la magnitud del daño (Fairbairn y cols. 1995). Las imágenes resultantes fueron nombradas como *cometas* debido a su apariencia. Si el ADN no está dañado, la falta de terminaciones libres y el gran tamaño de los fragmentos previene tal migración (Olive y Banath 2006). Previo a la electroforesis, las preparaciones son equilibradas en solución electrolítica alcalina que contiene baja concentración de sales, sin detergentes y generalmente pH alto (>12.3). Este periodo de incubación permite el desenrollamiento del ADN para ser iniciado a partir de rupturas en las hebras (Rojas y cols. 1999).

Este ensayo es una prueba de genotoxicidad altamente sensible, que ha sido utilizada para detectar un amplio espectro de daño al ADN (Fairbairn y cols. 1995), la versión alcalina del ensayo ha sido extensivamente empleada para evaluar la reparación de rupturas de hebras sencillas y en daño inducido al ADN por diversos agentes bajo una variedad de condiciones experimentales (*in vitro* o *in vivo*). Este ensayo también puede aplicarse para examinar el potencial genotóxico y protector de diversos productos naturales (Miyaji y cols. 2004).

En esta prueba, la posibilidad de analizar células de forma individual es una ventaja relevante en términos de identificar subpoblaciones que responden de diferente forma a un tratamiento citotóxico. Aunque el tamaño de muestra recomendado (50 cometas) puede ser inadecuado si hay heterogeneidad significativa. Otra limitante es el requerimiento de una suspensión celular viable. Si las muestras contienen predominantemente células necróticas o apoptóticas, la información precisa de la presencia de lesiones específicas podría no obtenerse. Además el ensayo cometa no provee información sobre el tamaño de los fragmentos ya que éstos no se separan durante el corto periodo de electroforesis. En contraste, a medida que incrementa el número de

Aunque el conocimiento de la estructura cromosómica aún es incompleto, la evidencia sugiere que las anomalías en los cromosomas son consecuencia y manifestación de directas del daño al ADN, por ejemplo, las rupturas en ellos pueden ser el resultado de fragmentos dobles no reparados y rearrreglos cromosómicos que pueden resultar de la reparación ineficiente de rupturas en el ADN (Kirsch-Volders y Fenech 2001). También se sabe que la pérdida y malasegregación cromosómicas (no disyunción) son eventos importantes en cáncer y envejecimiento y que probablemente son causados por defectos en el huso, centrómero o como consecuencia de la subcondensación de la estructura

### 2.3 Micronúcleos por bloqueo de citocinesis

Actualmente hay varios tipos de sistemas de registro en el ensayo cometa, incluyendo el continuo (porcentaje de ADN en la cauda y longitud de la misma) y varias descripciones de la distribución de las imágenes (Moller 2006).  
categorico (registro visual y agrupamiento en unidades arbitrarias), mediciones así como definida.

Los datos proporcionados por este ensayo incluyen información sobre la distribución del daño en el tejido diana (Fairbairn y cols. 1995). Esta distribución entre las células provee información sobre la heterogeneidad relativa del daño entre células en diferentes tejidos e indica la proporción de las células dañadas y no dañadas para cada dosis y tejido (Tice y cols. 1995). Una ventaja que ningún otro sistema puede ofrecer (Rojas y cols. 1999). Además, permite la obtención de resultados unas horas después del muestreo. Aunque la significancia biológica de la prueba aún no está firmemente

genes específicos con el uso de hibridación fluorescente *in situ* (Moller 2005).  
del ensayo cometa se incluye la detección de entrecruzamientos ADN-ADN, daño a mamaros (NHEK-267-1), células de pulmón (MRC5CV1). Entre las nuevas aplicaciones 145), melanoma (MeWo, HT-144), glioma (U-87), fibroblastos (IBR-3), queratinocitos de carcinomas (cérvix SiHa, HeLa), colon (WiDr, HT-29), vejiga (A1698), próstata (Dn- incluyendo células sanguíneas (Raji, TK6, HUT-78, HL-60 y MOLT-4), diferentes tipos En cuanto a estudios de genotoxicidad, se han empleado diversas líneas celulares

y Banáth 2006).

fragmentos, las asas superenrolladas se relajan, así que más terminaciones libres pueden migrar y por lo tanto una fracción mayor de ADN se aleja de la cabeza del cometa (Olive



En vista de las dificultades para experimentar directamente sobre el hombre, se han implementado una serie de sistemas de evaluación de daño genético como parte de una batería de pruebas para detectar el riesgo que diversas sustancias representarían para el ser

#### 2.4 Linfocitos de sangre periférica como sistema de prueba

En el ensayo de micronúcleos por bloqueo de citocinesis, las células que han completado una división nuclear son impedidas de desarrollar citocinesis por medio de citocalasina B (inhibidor de polimerización de actina requerida para la formación del anillo de microfilamento que construye el citoplasma entre el núcleo hijo durante la citocinesis) (Carter 1967).

Los micronúcleos se expresan en células en división que contienen cromosomas rotos sin centrómeros (fragmentos acéntricos) y/o cromosomas completos incapaces de migrar a los polos del huso durante la mitosis. En telofase, se forma una envoltura nuclear alrededor de los cromosomas y fragmentos no incorporados, se desarrollan y gradualmente asumen la morfología de un núcleo en interfase con la excepción de que son de menor tamaño que el núcleo principal en la célula, por lo tanto, los micronúcleos proveen un índice confiable tanto de ruptura como de pérdida cromosómica. Debido a que éstos se expresan en células que ya han completado la división nuclear, son evaluados en la etapa binucleada del ciclo celular (Fenech y Morley 1985, 1986).

El campo de la toxicología genética (Fenech 2000). Los eritrocitos de sangre periférica es una de las pruebas citogenéticas mejor establecidas en daño al ADN (Zalacain y cols. 2005). El ensayo de micronúcleos en médula ósea y Morley y validada a nivel mundial en 1999, es considerada un biomarcador efectivo de conocidos como cuerpos de Howell-Jolly. Esta técnica mejorada en 1985 por Fenech y independientemente por Schmid (1975) y Heddle (1973), los micronúcleos, también forma alternativa y más sencilla de evaluar el daño cromosómico *in vivo* fue propuesta estimulado el desarrollo de un sistema más simple de medir el daño cromosómico. Una forma provee el análisis más detallado, pero la complejidad y lo laborioso de contar e identificar aberraciones en metafase y el factor de confusión por artefactos han directamente al observar y contar aberraciones en metafases (Hayashi y cols. 1992). Esta forma provee el análisis más detallado, pero la complejidad y lo laborioso de contar cromosómica antes de la metafase (Hainaut y cols. 2001, Hussain y cols. 2001, Matter y cols. 2004). En técnicas clásicas de citogenética, los cromosomas se estudian

Una particularidad de la respuesta inmune que debe resaltarse es la capacidad del animal de producir un anticuerpo apropiado cada vez que se encuentra con un nuevo antígeno. Cada anticuerpo es una inmunoglobulina constituida por un tetramero formado por dos cadenas ligeras (L) idénticas y dos cadenas pesadas (H) idénticas. Todos estos tipos de cadenas comparten la misma organización general en la cual cada cadena proteínica consta de dos regiones principales: la región variable (V) N-terminal y la región constante (C) C-terminal. Como lo sugieren sus nombres, las regiones variables muestran considerables diferencias en sus secuencias, de una proteína a otra mientras que las regiones constantes mantienen una considerable homología. Se estima en centenas el total de regiones variables para las proteínas de cadenas ligeras o pesadas, mientras que el número de regiones constantes es mucho menor que el de regiones variables.

principalmente.

producen las proteínas que le habilitan para participar en la respuesta inmune genes en el linfocito. Este reordenamiento es un mecanismo para que los linfocitos cambios extensos en el contenido genómico cuando se crean por recombinación nuevos crear nuevos genes. El sistema inmune es un caso llamativo en el que se producen de ciertas secuencias de ADN es utilizada para la regulación de la expresión génica o para del organismo. Sin embargo hay situaciones excepcionales en las que la reorganización combinación del espermatozoide y el óvulo es heredada por todas las células somáticas

Es un axioma que la constitución genética originada en el cigoto a partir de la brevemente.

además de las particularidades de esta línea celular, que a continuación se abordarán relevancia del uso de linfocitos humanos como sistema de prueba en el presente trabajo, necesariamente lo produce en células humanas (Ashby 1988). Por lo anterior, destaca la una sustancia que puede provocar daño mutagénico en un sistema bacteriano, no constituido una fuente de error en la toma de decisiones, ya que se ha comprobado que y los sistemas metabólicos de los modelos utilizados difieren de los del hombre y esto ha ADN por agentes mutagénicos (Ashby y cols. 1985) no obstante, el nivel de organización Muchos sistemas de prueba se han empleado para determinar el daño inducido al

químicos, con el fin de obtener un panorama general.

ser usados como indicadores del daño genético inducido por mutágenos físicos y humano. Estos abarcan gran cantidad de organismos, tanto animales como vegetales, para



Las secuencias codificantes de cadenas ligeras o cadenas pesadas se ensamblan de la misma manera: cualquiera de los muchos segmentos génicos V se ensambla con alguno de los pocos segmentos génicos C. Esta recombinación somática ocurre en el linfocito B en el cual se expresa el anticuerpo. El gran número de segmentos génicos V disponibles es el responsable, en su mayor parte, de la diversidad de las inmunoglobulinas. Además de los segmentos génicos V y C, en los loci somáticos funcionales se incluyen otras secuencias cortas de ADN (incluyendo segmentos J y D). El segmento J toma su nombre de la abreviación de joining (en inglés, unión) dado que identifica la región a través de la cual se ensambla el segmento V. El segmento J es corto y codifica para los últimos 13 aminoácidos de la región variable cuando ésta se define por secuencia de aminoácidos. La construcción de una cadena pesada implica otro segmento más, el segmento D (de diversidad), éstos se organizan en tándem y suministran el resto de la región variable.

La comparación entre las secuencias de genes expresados de las inmunoglobulinas y los correspondientes segmentos génicos V de la línea germinal muestra como aparecen nuevas secuencias en la población expresada. Esta diversidad añadida se debe en parte a modificaciones en las secuencias de las uniones V-J o V-D-J. Sin embargo aparecen otros cambios sobre el dominio variable, que representan mutaciones somáticas inducidas específicamente en el linfocito activo. Estas necesitan el *enhancer* que activa la transcripción en cada locus Ig. Se da una correlación entre el hecho de la transcripción y la inducción de mutaciones, pero la base molecular de las mutaciones somáticas sigue siendo desconocida.

La mutación somática ocurre durante la proliferación clonal, aparentemente con un índice de  $10^3$  por pb por generación celular. Se calcula que la mitad de la progenie celular gana una mutación y como resultado las células que expresan anticuerpos mutados se convierten en una fracción importante del clon. Las mutaciones al azar tienen efectos impredecibles sobre las funciones proteicas; unas las inactivan mientras que otras les confieren una alta especificidad para un antígeno concreto. La proporción y efectividad de la respuesta de los linfocitos se ve aumentada por la selección entre la población de linfocitos de aquellas células portadoras de anticuerpos que tras la mutación han adquirido mayor afinidad por el antígeno (Levin 2001).



radical peroxilo tiene una vida media de aproximadamente un segundo. Entre los agentes de radicales libres es tan corta que sólo es posible tratar de reparar el daño. Por ejemplo el

- *Antioxidantes y quelantes de radicales libres*. La vida media de algunas especies de radicales libres es tan corta que sólo es posible tratar de reparar el daño. Por ejemplo el proceso, pero es incapaz de reaccionar con el ADN (Ferguson 1994).

(Hartman y Shankel 1990). En general, el mutágeno permanece intacto durante este proceso, pero es incapaz de reaccionar con el ADN (Ferguson 1994).

- *Quelantes*. Este mecanismo ocurre a través de la adsorción o unión covalente a grupos de aminoácidos, fenoles y algunos compuestos sulfurados (Bartsch y cols. 1988).

la dieta, por ejemplo, puede evitarse la formación de compuestos nitrosos por vitamina C, gastrointestinales y estas reacciones pueden inhibirse por ciertas clases de componentes de

sucede este tipo de activación en otros tejidos, especialmente aquellos del tracto gastrointestinal y estas reacciones pueden inhibirse por ciertas clases de componentes de genotóxicos requieren de activación metabólica para interactuar con el ADN. Aunque estos procesos ocurren comúnmente en el hígado hay evidencia creciente de que también

- *Prevención de la formación de las especies activas*. Muchos compuestos en hidrofóbicas que pueden excretarse (Ferguson 1994).

ser inactivados directamente pues en muchos casos, las sustancias tóxicas son convertidas reactivos y no sólo actúan sobre el ADN sino también sobre proteínas y enzimas, pueden

- *Inactivación química o enzimática*. Muchos mutágenos son químicamente inactivados directamente pues en muchos casos, las sustancias tóxicas son convertidas reactivos y no sólo actúan sobre el ADN sino también sobre proteínas y enzimas, pueden ser inactivados directamente pues en muchos casos, las sustancias tóxicas son convertidas reactivos y no sólo actúan sobre el ADN sino también sobre proteínas y enzimas, pueden

formas, por ejemplo por medio de:

Estos compuestos con propiedades genoprotectoras pueden actuar de diversas formas, por ejemplo por medio de:

vegetales (Kada y cols. 1984).

mutágenos por interacción directa; por ejemplo los pirolisados de triptófano son

- *Desmutágenos*. Estos se definen como aquellos agentes que inactivan los mutágenos por interacción directa; por ejemplo los pirolisados de triptófano son

disminución de la frecuencia de mutaciones (Ferguson 1994).

reparación y replicación del ADN dañado por cualquier mutágeno, resultando en una

- *Bioantimutágenos*. Los compuestos con esta actividad también son llamados verdaderos antimutágenos (Clarke y Shankel 1975) ya que actúan sobre los procesos de

## 2.5 Mecanismos de antimutagenicidad

Los inhibidores que reducen la frecuencia de mutaciones inducidas o espontáneas, sin tomar en cuenta los mecanismos involucrados, son llamados antimutágenos. Pueden clasificarse como:

buena fuente de aminoácidos, minerales y vitaminas hidrosolubles, recomendables para Guzmán y cols. 1997). Debido a su composición, se considera que los hongos son una buena fuente de aminoácidos, minerales y vitaminas hidrosolubles, recomendables para hongos contribuyen con vitaminas tales como C y B (B1, B2, B12 y niacina) (León-insaturados, correspondiendo a aproximadamente 4.0% con base en peso seco. Los hongos contribuyen con vitaminas tales como C y B (B1, B2, B12 y niacina) (León-insaturados, correspondiendo a aproximadamente 4.0% con base en peso seco. Los son bajos en calorías y su fracción grasa está principalmente constituida por ácidos grasos trigo (13.3%) y la leche (25.2%) (Martínez-Carrera y Larqué-Saavedra 1990); además mayoría de ellos tiene un contenido proteico muy alto (19-35%), en comparación con el de la dieta humana por largo tiempo. Son nutricionalmente importantes, ya que la necesarios. En muchas partes de México, los hongos silvestres comestibles han sido parte alternativas de dieta, tales como los hongos, algas, semillas de soya, entre otros, han sido provocado escasez de alimentos, principalmente en poblaciones pequeñas. Nuevas En nuestro país, la crisis socioeconómica y política de la última década ha

(Przybyłowicz y cols. 1988, Vetter 1994, Shah y cols. 1997, Manzi y cols. 2001). depende del sustrato, condiciones atmosféricas, edad y parte de la fructificación nutricional y propiedades, mismas que difieren de acuerdo con las especies pero también cols. 2001). La composición química de los hongos comestibles determina su valor incrementado de manera considerable, involucrando gran número de especies (Mattila y nutritivo (Ooi 2001). Actualmente las cantidades consumidas de estos organismos se han organismos tiene una larga historia de uso medicinal en el Oriente aunada a su valor propiedades medicinales (Díaz-Godínez y cols. 2002), razones por las que este grupo de La importancia de los hongos radica en su valor ecológico, económico, sabor y

## 2.6 Hongos silvestres comestibles, el caso de *Cantharellus cf. cibarius*

debido a la gran variedad de beneficios que ofrecen. cols. 1992, Lohman y cols. 2001), siendo los últimos el principal interés de este trabajo, polifenoles y componentes encontrados en té negros, verdes y en hongos (Brockman y como: beta caroteno, ácido ascórbico, ácido linoleico,  $\alpha$ -tocopherol, vainillina, clorofila, identificar gran número de propiedades antimutagénicas encontradas en alimentos, tales Varios estudios, incluyendo aquellos con ensayos a corto plazo han contribuido a (Hertog y cols. 1993).

con propiedad antioxidante se encuentran los carotenoides, retinoides y flavonoides



<i>Cantharellus cibarius</i>					
Contenido proximal (%)		Contenido mineral (ppm)		Contenido de vitaminas hidrosolubles (mg/100g)	
Grasa	0.72	Zn	41.72	Ácido fólico	0.055
Proteína	3.10	Cu	9.20	B1 (Tiamina)	0.300
Humedad	85.56	Na	388.00	B2 (Riboflavina)	0.117
Cenizas	1.77	Fe	10.47	B3 (Niacina)	5.94
Carbohidratos	8.86	Ca	21.32	B5 (Ácido pantoténico)	2.38
		Cr	107.93	Vitamina C (Ácido	4.97
		P		ascórbico)	

Tabla 1. Contenido proximal, mineral y vitamínico de *Cantharellus cibarius*

Tabla 1.

El consumo mundial de hongos del género *Cantharellus* se ha estimado entre 150-200 Kg/ton/año (Watling 1997). *Cantharellus* es ampliamente consumido en Europa, África, Asia y noroeste de Estados Unidos (Daneil 1994). *C. cibarius* es una especie en extinción en los bosques europeos (Arnoldo 1995), debido a que es ectomicorrizógeno, no puede cultivarse en composta o madera (Daneil 1999). Çaglarirmak y cols. (2002) determinaron el contenido de carbohidratos, minerales (Ca, Cr, Cu, Fe, K, Na, P y Zn) y las vitaminas: tiamina (B1), riboflavina (B2), niacina (B3), ácido pantoténico (B5) y ácido fólico de *Cantharellus cibarius* Fr. obteniendo los resultados que se muestran en la

evaluar su potencial como agente antígenotóxico.

*caesarea* y *Cantharellus* cf. *cibarius*, de los cuales el último fue seleccionado para zonas. Entre éstos, los tres más importantes resultaron: *Boletus pinophilus*, *Amanita* características, de los cuales, 74 especies se reconocieron como comestibles en tales cols. (2004), donde se identificaron 44 géneros y 93 especies de hongos con estas representar gran significancia cultural, tal como se reportó en el trabajo de Montoya y para la población local, pues constituyen un ingreso económico importante además de Martínez y cols. 1990, Acosta y Kong 1991, Kong 1998), muchos de éstos de utilidad La Malinche, se caracterizan por una amplia diversidad de hongos silvestres (Santiago-Los bosques del Estado de Tlaxcala, particularmente aquellos del Parque Nacional y cols. 2002).

países con nutrición deficiente, especialmente aquellos en vías de desarrollo (Çaglarirmak



Actualmente se sabe que las vitaminas contenidas en *C. cibarius* son útiles como agentes protectores de la estabilidad genética, por ejemplo:

- *Ácido fólico*. Es un intermediario metabólico central de la timidina requerida para la síntesis y reparación del ADN y como donador de metil para la formación de s-adenosil-metionina (necesaria para el mantenimiento del mecanismo que asegura la herencia epigenética de los patrones de metilación del ADN). La deficiencia de ácido fólico conduce a un incremento en los niveles de homocisteína que se considera un factor de riesgo para enfermedades cardiovasculares (Pancharuniti y cols. 1994) asimismo un bajo nivel de este compuesto implica el incremento del riesgo de inestabilidad genética (MacGregor 1990).

- *Vitamina B1*. La tiamina posee potencial antioxidante, a concentraciones de  $10^{-4}$ - $10^{-5}$  M, inhibe la peroxidación de lípidos en microsomas en hígado de rata así como la oxidación del ácido oleico *in vitro* (Lukienko y cols. 2000).

- *Vitamina B2*. La riboflavina es requerida para la activación de la vitamina B6 (piridoxina), ácido fólico, vitamina B3 (niacina) y vitamina K. Ajchart y cols. (1990) analizaron los efectos de la riboflavina sobre algunos mutágenos, encontrándose que inhibió la mutagenicidad de benzo(a)pireno y 2-acetaminofluoreno en presencia de la fracción hepática S9 pero no sobre MMS. Confirmando así la suposición de que la antimutagenicidad de la riboflavina resulta de su interacción con las enzimas responsables de la activación metabólica de promutágenos En un trabajo de revisión, se señala que la riboflavina, riboflavina-5'-fosfato y flavin adenin dinucleótido inhibieron la formación de aductos en el ADN por la aflatoxina I *in vitro*, siendo la riboflavina reportada como la más efectiva de las tres (Bhattacharya y cols. 1984). Se ha sugerido recientemente que el mecanismo de esta vitamina se basa en su capacidad de inducción de las enzimas involucradas en la reparación del ADN (Webster y cols. 1996).

- *Vitamina C*. Se han realizado varios estudios con el fin de investigar sus propiedades genotóxicas y/o antígenotóxicas y la mayoría de los resultados indican que la vitamina C es antimutagénica tanto en pruebas *in vitro* como *in vivo* en diferentes tejidos eucarióticos, linfocitos humanos, *Allium cepa* y *Drosophila* (Panda y cols. 1995; Susan y cols. 1995; Konopacka y cols. 1998). El efecto de la vitamina C (ácido ascórbico AA) sobre la mutagenicidad de la ciclofosfamida (CP) fue evaluado con el ensayo de micronúcleos en ratones suizos *in vivo*. La administración oral simultánea de la vitamina

localizados en la superficie del cuerpo fructífero, éstos protegen al hongo contra el daño. Además de los contenidos vitamínicos, *C. cibarius* contiene carotenoides, directa (Kaya 2003).

actúa sobre las especies reactivas de oxígeno sino también contra mutágenos de acción vitamina C contra los radicales, pero los resultados de este trabajo muestran que no sólo ADN celular. La mayoría de los estudios previos muestran los efectos protectores de la actividad antimutagénica observada del ácido ascórbico contra los mutágenos probados ascórbico también redujo la genotoxicidad en todos los tipos de clones mutantes. La indica un porcentaje de reducción de daño, se concluyó que en el caso de ENU, el ácido mutación de 61.5% a 42.5% para EMS, de 66.7% a 45.9% para MMS y aunque no se etilurea (ENU), trabajo en que se encontró que la vitamina C disminuyó la tasa de directa, etil metanosulfonato (EMS), metil metanosulfonato (MMS) y N-nitroso N-*Drosophila* (SMART) en tratamiento simultáneo con tres agentes alquilantes de acción concentración de 17 mM, por medio del ensayo de mutación somática y recombinación En un estudio más reciente se evaluó la actividad antigénotoxica del AA a una

asociadas con la exposición de las células AS52 al estrés oxidante (Bijur y cols. 1997). en una inhibición estadísticamente significativa de la citotoxicidad y mutagenicidad (M) durante 24 horas previas al tratamiento con un sistema generador de radicales resultó relevante de AA (50  $\mu$ M) y el estrés oxidante. El tratamiento de las células con AA (50  $\mu$  relación temporal entre ambas actividades de una concentración fisiológicamente celular AS52 de ovario de ericeto chino como sistema modelo, mostraron que hay una oxidante durante el estrés de esta clase. Los resultados de un estudio utilizando la línea para elucidar los mecanismos moleculares que expongan si funciona como anti o pro- 1996). El AA tiene actividad antioxidante y prooxidante. Sin embargo, no hay estudios mutagenicidad de compuestos N-nitrosos una vez que se han formado (Norkus y cols. intragástrica de los compuestos N-nitrosos pero que no tiene efecto sobre la Algunos estudios sugieren que el ácido ascórbico puede bloquear la formación

1981). significativo sobre un amplio intervalo de dosis (1.56-200 mg/Kg) (Chaskadbi y cols. con CP intraperitoneal disminuyó la frecuencia de eritrocitos policromáticos micronucleados causados por el mutágeno. Mostrando un efecto antimutagénico



2002). Los carotenoides bicíclicos son los responsables del color amarillo de muchos *Cantharellus* (Arpin y cols. 1971, Gill y cols. 1987, Mui y cols. 1998). Los carotenoides son comunes en plantas verdes, donde actúan como pigmentos, antioxidantes y protectores contra luz UV, estos productos químicos son raros en hongos. *Cantharellus* grupo *cibarius* y *C. minor* contienen  $\beta$ -carotenos y pequeñas cantidades de otros carotenoides (Gill y cols. 1987).

La vitamina A, sintetizada a partir de  $\beta$ -caroteno (Jensen y cols. 1984). Los carotenoides encontrados en *C. cinnabarinus* y *C. friessi* se componen casi completamente por canthaxantina, un pigmento encontrado también en el salmón y las plumas de flamíngos (Gill y cols. 1987). Se ha reportado que la canthaxantina protege del daño oxidativo a los tejidos humanos (Chen y cols. 1996) y es vendida como antioxidante.

*Cantharellus* también contiene altos niveles de vitamina D (Mattila y cols. 1994), una vitamina sintetizada a partir del ergosterol cuando la luz incide sobre los tejidos. Tales concentraciones de vitamina D varían considerablemente, pero se mantienen altas incluso cuando los hongos son deshidratados y almacenados por más de 6 años (Rangel-Castro y cols. 2002). Altas concentraciones de vitamina D podrían desempeñar un papel importante en la protección de *Cantharellus* contra rayos UV y como resistencia a la predación de insectos (Rangel-Castro 2001). También ha sido determinado el contenido de vitamina D (D2 o ergocalciferol) en fructificaciones de *C. cibarius* de Suecia, siendo éste de 14.2  $\mu\text{g}/100$  g de materia fresca, lo cual resulta ser mayor al contenido de vitamina D3 (colecalciferol) de otros productos, tal como se muestra en la Tabla 2:

Tabla 2. Contenido de vitamina D (D2 ergocalciferol en hongos; D3 colecalciferol en otros

Producto alimenticio	Contenido de vitamina D $\mu\text{g}/100$ g de materia fresca
<i>Cantharellus cibarius</i>	14.2 (promedio)
Anguilas ahumadas	36 (SNFA)*
Sardinas en aceite	15 *
Trucha arcoiris	13.6 *
Margarina enriquecida	7.5 *
Pollo	1.5 *
Leche enriquecida	0.38 *

SNFA, Swedish National Food Administration (1996) *En* Rangel-Castro y cols. 2002.



• El cuerpo fructífero de *Agaricus blazei* es fuente de ácido linoleico (ácido graso insaturado que representa el 70-78% de los lípidos totales del esporoma), obtenidos en extractos hexánicos y ácido trans-1-octadecadienoico y 13-hidroxi-cis-9 en cloroformo etanol (2:1). El ácido linoleico ha sido identificado como la principal sustancia con actividad antimutagénica contra el mutágeno benzopireno en el ensayo de Ames en *Salmonella*. El segundo compuesto identificado ha exhibido actividad antibacterial pero no antimutagénica (Osaki y cols. 1994). Se conocen varios polisacáridos anticarcinogénicos de este hongo, la mayoría formados por compuestos con cadenas de D-glucosa y enlaces B-1,3 (Kawagishi y cols. 1989). La fracción antitumoral es obtenida en forma de complejo proteína-polisacárido, llamado FIII-2-b, con un 50.2% de

comestibles y no comestibles se encuentran los siguientes:  
Entre los estudios realizados para evaluar las propiedades antígenotóxicas de hongos

## 2.6 Estudios sobre antigenotoxicidad fúngica

2004).  
mediante la Norma Oficial Mexicana (NOM-059-Ecol-1994) (Guevara-Guerrero y cols. severos daños a los ecosistemas. Para evitarlo, el gobierno federal protege este recurso *Populus* sp. y *Tsuga* sp. El aprovechamiento irracional de este recurso está ocasionando *Pseudotsuga* spp., *Abies* spp., *Betula* spp., *Castanea* sp., *Fagus* sp., *Fucalipus* sp., sus raíces, con árboles de importancia forestal: *Quercus* spp., *Pinus* spp., *Picea* spp., *cedar*. Esta última es originaria de Europa y crece en asociación simbiótica, a través de cosmopolitas dentro del género *Cantharellus* y 16 variedades dentro de la especie tipo *C. importancia ecológica, económica y nutricional. Existen aproximadamente 65 especies Aunado a la relevancia nutritiva, las especies del género *Cantharellus* son de gran respiratorio e inhibe el crecimiento de sarcomas (Ying 1987, Hobbs 1995). que la ingestión de *C. cedarius* incrementa la resistencia a ciertas enfermedades del tracto metabólicos hidroxilados de estos esteroides regulan el transporte de calcio. Se ha citado seres humanos (Outila y cols. 1999; Budavari 1996), de forma similar a las hormonas, los (Budavari 1996). Ergocalciferol y colecalciferol tienen la misma actividad metabólica en El ergocalciferol se sintetiza a partir del ergosterol bajo la acción de luz UV*

• Nuevamente con extractos acuosos preparados a las tres temperaturas ya citadas, Delmanto y cols. (2001) evaluaron los efectos antimutagénicos de *Agaricus blazei* Murrill sobre la genotoxicidad por ciclofosfamida (CF) a dosis finales de 25 y 50 mg/Kg en eritrocitos policromáticos y reticulocitos de ratones suizos (♂) en dos experimentos. En el primero se formaron 12 grupos de 12 animales cada uno, a quienes se les suministraron los tratamientos de la siguiente manera: un grupo con suministro de NaCl al 0.9% como testigo negativo, dos con CF como testigos positivos, seis con suministro de 0.6 ml/día de una mezcla de extractos de las cepas AB 96/07, AB 96/09 y AB 97/11 de *Agaricus blazei* Murrill preparadas a 4, 21 y 60° C durante dos semanas previas al tratamiento intraperitoneal con CF al día 15 y por último tres con suministro único de extractos fungicos. Por dislocación cervical al día 16 se obtuvieron los eritrocitos policromáticos micronucleados de médula espinal para el análisis de micronúcleos. En el segundo experimento se formaron ocho grupos de 20 animales cada uno de la siguiente manera: uno con suministro de NaCl al 0.9% como testigo negativo, otro con suministro

• Se evaluaron los efectos antimutagénicos de las cepas AB 96/07, AB 96/09 y AB 97/11 de *Agaricus blazei* Murrill. Se prepararon extractos acuosos a tres temperaturas diferentes (2-8° C, 20-25° C y 60° C) en concentraciones de 0.05, 0.1 y 0.15 % respectivamente, adicionadas a los cultivos de células V79 utilizando MMS ( $1.6 \times 10^{-4}$  M en el ensayo cometa y  $4 \times 10^{-4}$  M en el ensayo de MN) como mutágeno. Los protocolos de tratamiento fueron previo, simultáneo y posterior. Se obtuvieron los siguientes resultados con el ensayo cometa: el tratamiento simultáneo con los tres extractos no mostró efectos antigenotóxicos; en el pre-tratamiento los extractos redujeron el daño de forma eficiente (más de 50%). En cuanto al post-tratamiento no se encontraron diferencias importantes. Con el ensayo de MN se observó una disminución estadísticamente significativa de las frecuencias de micronúcleos en todas las concentraciones estudiadas. Los datos de porcentaje de reducción de frecuencia de micronúcleos en los distintos tratamientos fueron de 90% en el simultáneo, entre 69.2 y 94.9% en el previo y entre 61.5 a 102.6% en el posterior (Menoli y cols. 2001).

carbohidratos y 43.3% de proteínas (Kawagishi y cols. 1990; Mizuno y cols. 1990; Itoh y cols. 1994).



De manera similar al trabajo anterior, Bellini y cols. (2003) evaluaron el efecto anticlastogénico de *Agaricus blazei*, cepa ABM 99/26, deshidratado y preparado como extracto acuoso a temperaturas de 4, 25 y 60°C, pero en esta ocasión también se evaluó la anticlastogénicidad de los estados de maduración de la cepa ABM 97/11, definidos como fase joven y en esporulación. Se empleó MMS como agente alquilante (en concentración de  $10^{-4}$  M), con el ensayo de aberraciones cromosómicas en ambos casos.

Se evaluó el mecanismo de anticlastogénicidad de extractos orgánicos (etanol absoluto y cloroformo/metanol 3:1) en células de ovario de ericeto chino (CHO) K1 (tipo silvestre) y xrs 5 (deficientes en reparación de hebras dobles de ADN) con los ensayos de aberraciones cromosómicas (AC) e intercambio de cromátidas hermanas (ICH) como indicadores de daño genético y MMS (en concentración de  $10^{-4}$  M) como mutágeno. Para los tratamientos de AC en células CHO-K1, los extractos fueron usados a concentraciones finales de 0.03, 0.06 y 0.09%. Sólo el extracto a 0.06% fue utilizado en el ensayo de AC en células CHO-xrs 5 y de ICH en células CHO-K1. Los resultados indicaron porcentajes de reducción de AC de 33.33, 46.15 y 61.54 para los extractos en etanol a 0.03, 0.06 y 0.09%, respectivamente. Para los extractos de cloroformo/metanol a concentraciones de 0.03, 0.06 y 0.09% reducciones de AC de 53.84, 56.42 y 30.77%, respectivamente. Concluyendo que la ausencia de efectos protectores a la concentración de 0.09% del extracto cloroformo/metanol pudo deberse a una extracción efectiva de ácidos grasos de mayor peso molecular, los cuales podrían competir con el ácido linoleico para acoplarse con la ADN polimerasa (Luiz y cols. 2003).

Se evaluó el mecanismo de anticlastogénicidad de extractos orgánicos (etanol absoluto y cloroformo/metanol 3:1) en células de ovario de ericeto chino (CHO) K1 (tipo silvestre) y xrs 5 (deficientes en reparación de hebras dobles de ADN) con los ensayos de aberraciones cromosómicas (AC) e intercambio de cromátidas hermanas (ICH) como indicadores de daño genético y MMS (en concentración de  $10^{-4}$  M) como mutágeno. Para los tratamientos de AC en células CHO-K1, los extractos fueron usados a concentraciones finales de 0.03, 0.06 y 0.09%. Sólo el extracto a 0.06% fue utilizado en el ensayo de AC en células CHO-xrs 5 y de ICH en células CHO-K1. Los resultados indicaron porcentajes de reducción de AC de 33.33, 46.15 y 61.54 para los extractos en etanol a 0.03, 0.06 y 0.09%, respectivamente. Para los extractos de cloroformo/metanol a concentraciones de 0.03, 0.06 y 0.09% reducciones de AC de 53.84, 56.42 y 30.77%, respectivamente. Concluyendo que la ausencia de efectos protectores a la concentración de 0.09% del extracto cloroformo/metanol pudo deberse a una extracción efectiva de ácidos grasos de mayor peso molecular, los cuales podrían competir con el ácido linoleico para acoplarse con la ADN polimerasa (Luiz y cols. 2003).

de agua durante dos semanas y 50 mg/Kg de CF al día 15, tres con 0.6 ml/día del extracto acuoso de la cepa AB 99/26-Junio 17 durante dos semanas y una dosis intraperitoneal de 50 mg/Kg de CF al día 15 y finalmente tres grupos de animales a los cuales se les dio únicamente 0.6 ml/día de soluciones de extractos de *A. blazei* de la cepa ya citada. Los resultados del primer experimento mostraron una reducción de la frecuencia de micronúcleos de 38.8 a 78.8% de los extractos preparados a 60 y 4°C, respectivamente. En cuanto al segundo experimento, los datos mostraron que las soluciones preparadas a las diversas temperaturas no influyeron significativamente en las frecuencias de MN inducidas por el mutágeno.



• Se evaluó la antigenotoxicidad de extractos en cloroformo:metanol (3:1) de las cepas AB 97/29 en fase joven y en esporulación; mezcla de cepas (AB 96/07, AB 96/09 y AB 97/11); AB PR y AB SP utilizados en concentraciones finales de 20, 40 y 80  $\mu\text{l/ml}$  para el ensayo de micronúcleos y 60  $\mu\text{l/ml}$  para el ensayo cometa con MMS a  $4 \times 10^{-4}$  M

• Con el fin de comparar los efectos antimutagénicos de extractos acuosos de *A. blazei* provenientes de cultivos de diferentes regiones (nombradas AB PR y AB SP preparadas a 60° C) y de la cepa AB 97/29 en dos fases de desarrollo (joven y en esporulación) preparadas a 4, 25 y 60° C, por medio de los ensayos cometa y micronúcleos en células V79 y MMS como mutágeno (en concentraciones de  $1.2 \times 10^{-4}$  M y  $4 \times 10^{-4}$  M, respectivamente). Se evaluaron los pre-tratamientos, co-tratamientos y post-tratamientos para los ocho tipos de extractos, todos con incubación de una hora. De acuerdo con los resultados, se concluyó que los extractos de AB 97/29 (fase joven y en esporulación) a las tres temperaturas probadas pero también AB PR y AB SP a 60° C no mostraron ningún tipo de protección contra la inducción de cometas por MMS. En contraste, con el ensayo de micronúcleos los resultados indicaron que la cepa AB SP mostró diferencias significativas entre las medias de los tratamientos y el testigo positivo en las tres condiciones de tratamiento con reducciones de 37.9 %, 31.14 % y 32.44% en pre-, co- y post-tratamiento, respectivamente. En cuanto a la cepa AB PR los datos señalaron un efecto significativo sólo en el pre-tratamiento (Gutierrez y cols. 2004).

• Para la primera cepa se llevaron a cabo tres tratamientos, es decir, cada extracto (4, 25 y 60° C) en incubación simultánea con MMS durante 12 horas. Para la segunda cepa se probaron ocho tratamientos, evaluando la fase joven y en esporulación en cada una de las tres temperaturas (4, 25 y 60° C) también en incubación simultánea con MMS durante 12 horas. Los resultados mostraron un porcentaje de reducción de aberraciones cromosómicas de 70 (ABM/4° C) a 97.5% (ABM/60° C) para los extractos de la cepa ABM 99/26 y de 69 (ABM en esporulación/60° C) a 93.1% (ABM en fase joven/60° C) para los extractos de ABM 97/11. En este trabajo los extractos de hongos de fase joven tuvieron mayor eficiencia y produjeron las mayores reducciones de daño al ADN, indicando que los hongos en fases avanzadas de desarrollo son menos eficientes en este sentido, probablemente debido a ciertas modificaciones en su composición química

- Se investigaron las propiedades antígenotóxicas de extractos en metanol (EM), hexano (EH), n-butanol (EB) y acuosos (EA) (en concentraciones finales de 100 µg/ml) de la cepa AB 99/26 en células CHO-k1 (no metabolizadoras de drogas) y HTC (metabolizadoras de drogas) con los ensayos de aberraciones cromosómicas y Micronúcleos con etil metanosulfonato (EMS en concentración final de 310 µg/ml) y 2-aminoantraceno (2-AA en concentración final de 1 µg/ml) como mutágenos alquilantes de acción directa e indirecta respectivamente. Todos los extractos se sometieron a tratamientos simultáneos durante 12 horas para las células CHO-K1+EMS y de 24 horas para las células HTC+2-AA. En cuanto a aberraciones cromosómicas los resultados de anticlastogenicidad mostraron un porcentaje de reducción de 63.1% (EM), 94.7% (EH), 105.2% (EB) y 126.3% (EA). Para el ensayo de micronúcleos sólo se utilizó el extracto de n-butanol en tratamiento simultáneo sin pre-incubación obteniendo una reducción de la frecuencias de micronúcleos de 71.2% contra el daño inducido por 2-AA y de 79.1% contra EMS y con pre-incubación se obtuvieron reducciones de 83.8% contra el daño por 2-AA y 75.6% contra el daño por EMS. Concluyendo que la eficacia observada de los extractos acuosos y orgánicos se debe a las sustancias presentes en los diferentes tipos de extractos, pudiendo ser β-glucanos, vitaminas, aminoácidos esenciales, ácido linoleico y otros (Bellini y cols. 2006).
- Se evaluó el potencial de *Lentinula edodes* para modular los efectos genotóxicos inducidos por los agentes alquilantes ciclofosfamida (CF) en dosis de 25 y 50 mg/Kg y

con incubaciones de una hora en pre-, co- y post-tratamiento. Los extractos obtenidos de los linajes AB 97/29 en ambas fases de desarrollo, mezcla de cepas, AB PR y AB SP mostraron actividad antimutagénica a las tres concentraciones probadas, con disminuciones de frecuencia de MN entre 50 y 94% con respecto al testigo negativo. El mayor porcentaje de reducción en las frecuencias de MN (67 a 94%) se obtuvo a la concentración de 80 µl/ml para todos los extractos orgánicos con tratamiento simultáneo. Para el ensayo cometa todos los extractos probados mostraron una reducción de daño menor al 50%, aunque las reducciones de daño de AB 97/29 (fase joven) y mezcla AB, ambos en pre-tratamiento no fueron estadísticamente significativas (Gutierrez y cols. 2005).



N-etil-N-nitrosourea (ENU) en 25 mg/Kg en un bioensayo con ratones suizos con los ensayos de micronúcleos en eritrocitos policromáticos de médula ósea (EPMO) y en reticulocitos de sangre periférica (RSP) y ensayo cometa en células de sangre periférica. Se realizaron dos experimentos, en el primero se evaluaron las propiedades de una mezcla de extractos acuosos de siete cepas del hongo (LE 95/016, 96/14, 96/17, 96/22, 96/23, 97/27 y 97/28) en 12 grupos de 12 animales cada uno, a seis grupos se les suministraron los extractos preparados a 4, 21 y 60° C durante dos semanas previas al tratamiento con dosis de 25 y 50 mg/Kg de CF. Otros tres grupos fueron sometidos a tratamientos con los tres diferentes extractos acuosos del hongo durante dos semanas. El resto de los animales conformaron los respectivos grupos testigo. En un segundo experimento se evaluó el extracto acuoso de una cepa (LE 96/17) en 12 grupos de 20 animales cada uno. Tres grupos se sometieron a tratamientos con extractos acuosos por dos semanas previas al suministro intraperitoneal de una dosis de CF de 50 mg/Kg. Tres grupos más fueron sometidos a este tipo de tratamiento, pero en lugar de CF se utilizó ENU a dosis de 50 mg/Kg. El resto de los grupos correspondieron con los testigos de la prueba. Los resultados del primer experimento mostraron una reducción sobre la frecuencia de MN en EPMO de 7, 44 y 68% (25 mg/Kg CF) y de 10, 52 y 21% para los extractos a 60, 21 y 4° C, respectivamente. En cuanto a MN en RSP los porcentajes de reducción fueron 40, 52 y 61% (25 mg/Kg CF) y 51, 80 y 66% para los extractos a 60, 21 y 4° C, respectivamente. En el experimento dos se obtuvieron datos de porcentajes de reducción de frecuencias de MN en EPMO de 21, 11 y 43% contra dosis de 50 mg/Kg de CF y 23, 1 y 25% contra dosis de 50 mg /Kg de ENU, en ambos casos los extractos utilizados correspondían a una preparación a 4, 21 y 60° C, respectivamente. En relación a RSP los porcentajes fueron de 36, 38 y 47% (contra dosis de CF de 50 mg/Kg) y de 19, 16 y 30% (contra dosis de 50 mg/Kg de ENU), extractos de preparación a 4, 21 y 60° C, respectivamente (De Lima y cols. 2001).

• Extractos acuosos de la cepa LE 96/17 fueron probados por medio del ensayo cometa contra la mutagenicidad de MMS (concentración final de  $4 \times 10^{-4}$  M) en células de carcinoma epidermoide de laringe humana (HEp-2) bajo los protocolos experimentales pre-, co- y post-tratamiento con extractos preparados a  $4, 22 \pm 0.5$ ° C y 60° C y usados a concentraciones finales 0.5, 1.0 y 1.5 mg/ml cada uno. Todos fueron incubados durante



Se investigó el potencial antigenotóxico de *Agroclybe cylindracea*, *Lentinula edodes* y *Pleurotus ostreatus*. Se utilizaron dos ensayos *in vivo*: la prueba de reparación de ADN de *Drosophila* y la prueba de manchas en las alas de *Drosophila* (prueba conocida como SMART), que mide las mutaciones y recombinación somática. Se

Bajo el mismo diseño experimental anterior, Miyaji y cols. (2006) probaron extractos acuosos de la cepa LE 96/17 en células HEP-2, pero ahora con el ensayo de micronúcleos. Los resultados mostraron altos porcentajes de reducción de frecuencia de micronúcleos. En el pre-tratamiento fueron de 82.92, 80.48 y 85.36% (0.5, 1.0 y 1.5 mg/ml/4° C), 90.24, 90.24 y 97.56% (0.5, 1.0 y 1.5 mg/ml/22±2° C) y 92.68, 82.92 y 85.36% (0.5, 1.0 y 1.5 mg/ml/60° C). En el tratamiento simultáneo fueron de 87.71, 85.96 y 85.96% (0.5, 1.0 y 1.5 mg/ml/4° C), 94.73, 92.98 y 96.49 (0.5, 1.0 y 1.5 mg/ml/22±2° C) y 84.21, 89.47 y 96.49 (0.5, 1.0 y 1.5 mg/ml/60° C). Por último, en el post-tratamiento se encontraron porcentajes de 80.00, 80.00 y 77.14% (0.5, 1.0 y 1.5 mg/ml/4° C), 94.28% para las tres concentraciones de extractos a 22±2° C y de 80.00, 77.14 y 82.85% (0.5, 1.0 y 1.5 mg/ml/60° C). En este caso todos los tipos de extractos probados mostraron su potencial como agentes antimutagénicos *in vitro* protegiendo las células HEP-2 de la mutagénesis de MMS independientemente del protocolo utilizado.

Los resultados de los diferentes tratamientos mostraron reducciones de daño de dos horas. En el tratamiento simultáneo las reducciones de daño fueron de 66.36, 77.57 y 54.19% (0.5, 1.0 y 1.5 mg/ml/4° C), 70.09, 85.03 y 43.93% (0.5, 1.0 y 1.5 mg/ml/22±2° C) y 60.75, 66.36 y 71.01% (0.5, 1.0 y 1.5 mg/ml/60° C). Por último, para el post-tratamiento los porcentajes de disminución fueron de 69.10, 62.59 y 78.05% (0.5, 1.0 y 1.5 mg/ml/4° C), 65.02, 75.61 y 80.49% (0.5, 1.0 y 1.5 mg/ml/22±2° C) y 79.66, 69.90 y 80.49% (0.5, 1.0 y 1.5 mg/ml/60° C). Sin embargo, se concluyó que la actividad protectora de los extractos acuosos ocurrió únicamente en los experimentos simultáneos a 22±2° C con 1.0 mg/ml de hongo y en el post-tratamiento con 0.5 mg/ml de hongo a 4° C puesto que en el resto de los extractos no se encontraron diferencias estadísticamente significativas (Miyaji y cols. 2004).

<sup>3</sup> 2-acetilaminofluoreno  
<sup>4</sup> 7, 12-dimetilbenzo(a)antraceno  
<sup>5</sup> 3-amino-3-metilimidazo (4,5-f) quinolina  
<sup>6</sup> 2-amino-3,8-dimetilimidazo (4,5-f)quinoxalina  
<sup>7</sup> N-metil-N-nitrosourea  
<sup>8</sup> N-nitrosodimetilamina  
<sup>9</sup> 4-nitroquinolina N-óxido

• El único antecedente conocido sobre el uso de linfocitos humanos para probar la antigenotoxicidad fungica corresponde a Park y cols. (2005), quienes estudiaron el efecto de extractos etanólicos de *Monotus obliquus* (en concentraciones de 6.25, 12.5, 25, 50 y 100 µg/ml), un hongo proveniente de Rusia, fueron evaluados por su potencial antigenotóxico en mononucleares humanos de dos donadores sanos contra el daño oxidante inducido por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (en concentración final de 200µM durante 5 minutos). Se llevaron a cabo tres protocolos experimentales, pre-, co- y post-tratamiento, en los cuales la incubación con los extractos fungicos fue de 30 minutos a 37° C en cada tipo de tratamiento. Como resultado se encontró que el efecto inhibidor del daño al ADN por *I. obliquus* incrementó en relación positiva al aumento de su concentración hasta alcanzar el 80% de reducción de daño. Especialmente, la concentración más alta (100 µg/ml) no mostró diferencias estadísticas significativas comparadas con el testigo negativo.

probaron ocho carcinógenos 2-AAF<sup>3</sup>, aflatoxina B<sub>1</sub>, DMA<sup>4</sup>, IQ<sup>5</sup>, MeIQ<sup>6</sup>, MNU<sup>7</sup>, NDMA<sup>8</sup> y 4NQO<sup>9</sup>. Se encontró que los polvos de *A. cylindracea* y *P. ostriatus* pudieron inhibir el daño provocado por los ocho mutágenos. En contraste, *L. edodes* sólo inhibió el daño por aflatoxina B<sub>1</sub>, NDMA, MNU y 4NQO. *A. cylindracea* también suprimió las mutaciones somáticas inducidas por aflatoxina B<sub>1</sub>, MMC, MNU, NDMA, NMOR y 4NQO. Estos resultados sugirieron que el género *Agropybe* contiene factores con actividad antigenotóxica, incluyendo actividad anti-recombinogénica. Además, la antigenotoxicidad del polvo de *A. cylindracea* pudo extraerse en agua pero no en etil acetato ni metanol. Su alto peso molecular y termosensibilidad sugieren que se trata de un péptido o una proteína (Taira y cols. 2005).



### 3. JUSTIFICACIÓN

La ocurrencia de mutaciones es un factor clave en la evolución y a menudo se asocia con otros procesos fundamentales de vida tales como el envejecimiento y con una variedad de condiciones patológicas, incluyendo cáncer y teratogenicidad (Shankel y cols. 1987). Además, algunos mutágenos y carcinógenos típicos tales como los agentes causantes de daño oxidante a las células, también se involucran con la patogénesis multifactorial de otras enfermedades como ataques cardíacos, apoplejía o enfisema (Marx 1987). Es por esto que la identificación de agentes antimutágenos presentes en la dieta representa una estrategia efectiva para inhibir procesos patológicos resultantes de la exposición al creciente número de sustancias mutagénicas y/o carcinogénicas en el ambiente (Wattenberg 1983 y 1985, Ferguson 1994).

Como se muestra en este trabajo, debido a que la mayoría de las investigaciones sobre antigenotoxicidad se ha realizado con hongos cultivados, es necesario evaluar el potencial antigenotóxico de hongos silvestres que además de ser consumidos por diversas culturas, en el caso de nuestro país y el estado de Tlaxcala, son especialmente apreciados por habitantes de poblaciones marginadas, donde en época de lluvias constituyen una parte importante de la alimentación. Por lo tanto, se seleccionó a *Cantharellus* cf. *cibarius*, una especie de hongo silvestre comestible debido a su importancia en varias zonas del estado de Tlaxcala (Montoya y cols. 2004), además del fundamento correspondiente a la información bromatológica disponible sobre tal especie. Debido a que las vitaminas hidrosolubles contenidas en *C. cf. cibarius* cuentan con antecedentes de protección contra daño al ADN celular se decidió evaluar el potencial antigenotóxico de los extractos acuosos, sin descartar la posibilidad de la presencia de compuestos de naturaleza desconocida que podrían atribuirle esta propiedad.

### 4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

¿Los extractos acuosos de *Cantharellus* cf. *cibarius* pueden inhibir y/o reparar el daño inducido por metil metanosulfonato (MMS) en el ADN de linfocitos humanos en cultivo.

Los cuerpos fructíferos recolectados fueron caracterizados. Posteriormente se incorporaron los respaldos de los mismos en el herbario TLXM de la Universidad Autónoma de Tlaxcala. La deshidratación de los esporomas se realizó en una secadora eléctrica durante un tiempo de 24-72 horas dependiendo del contenido de humedad de los

#### 7.2 Fase de gabinete

Se recolectaron esporomas maduros de *Cantharellus* cf. *cibarius* en el bosque de *Abies religiosa* de la Cañada Grande del Parque Nacional La Malinche, Tlaxcala en la época de lluvias de 2006.

#### 7.1 Fase de campo

### 7. MATERIALES Y MÉTODOS

1. Estandarizar el ensayo cometa para evaluar antigenotoxicidad en cultivos de linfocitos humanos.  
 2. Estandarizar el ensayo de micronúcleos para evaluar antigenotoxicidad en linfocitos humanos en cultivo.  
 3. Evaluar la antigenotoxicidad de los extractos acuosos en cultivos de linfocitos de individuos sanos con tres protocolos experimentales (tratamiento previo, simultáneo y posterior).

#### 6.2 Objetivos específicos

Evaluar las propiedades antigenotóxicas de extractos acuosos de *Cantharellus* cf. *cibarius* en cultivos de linfocitos humanos, por medio de los ensayos de electroforesis unicelular en gel (ensayo cometa) y micronúcleos por bloqueo de citocinesis (MN).

#### 6.1 Objetivo general

### 6. OBJETIVOS

Si los extractos acuosos de *Cantharellus* cf. *cibarius* presentan propiedades antigenotóxicas, entonces es posible que inhiban y/o reparen el daño inducido por MMS en el ADN de linfocitos humanos en cultivo.

### 5. HIPÓTESIS



Una vez estandarizado el ensayo cometa, se realizó una serie de pruebas piloto con muestras de sangre periférica de donadores que cumplieron con los criterios de inclusión ya señalados. Por medio de curvas dosis-respuesta se determinó la concentración y tiempo de incubación de los cultivos con MMS (35  $\mu$ M con incubación de 2 horas) mismo que se utilizó como mutágeno durante la fase experimental. De la misma manera, se determinaron cinco concentraciones de extractos fúngicos a probar (5, 10, 20, 40 y 80

### **7.5.1 Etapa exploratoria**

## **7.5 Fase de laboratorio**

Se sabe que las fluctuaciones hormonales propias del sexo femenino influyen de manera importante sobre el ciclo celular así como en el incremento de la frecuencia de intercambios de cromátidas hermanas (Hill y Wolff 1983) y aumentar la variación en cuanto a la respuesta a ciertos tipos de daño, por ejemplo a la radiación (Roberts y cols. 1997). Por lo tanto se decidió llevar a cabo el estudio con cinco donadores de sexo masculino, edades entre un intervalo de 22 a 33 años, quienes debieron ser sujetos saludables, sin hábitos de tabaquismo ni de ingestión de alcohol, debido al efecto de los subproductos del metabolismo de éstos sobre los ácidos nucleicos y el entorno celular en general.

## **7.4 Criterios de inclusión de donadores de sangre**

Los carpóforos deshidratados se prepararon de acuerdo con el método propuesto por Rodrigues-Notoya y cols. (2001), Delmanto y cols. (2001), Miyaji y cols. (2004, 2006), que consistió en pulverizarlos manualmente con ayuda de un mortero y pistilo. Se pesaron 5 g del polvo obtenido y se les agregaron 200 ml de agua desionizada en un vaso de precipitados, donde la mezcla se sometió a agitación durante 10 minutos a temperatura ambiente. Después de transcurrido este tiempo los extractos se filtraron con papel filtro común y posteriormente con filtro bacteriológico de 0.20 $\mu$ m (Millipore). El extracto estéril se mantuvo en refrigeración (4-10 °C) hasta su uso.

## **7.3 Preparación de extractos acuosos**

especímenes a una temperatura aproximada de 60 °C. Una vez terminado este proceso se depositaron en bolsas de plástico negras y se almacenaron en un sitio fresco y seco.

µl de extracto acuoso fúngico/ml de medio de cultivo RPMI 1640), con base en la respuesta celular evaluada por medio del porcentaje de viabilidad celular por medio de tinción con azul de tripano al 0.4%.

### 7.3.3 Etapa experimental

Previamente al inicio de los experimentos correspondientes al ensayo cometa, se extrajeron 25 ml de sangre periférica por punción venosa de cada uno de los donadores. Después de obtenido el volumen sanguíneo indicado se realizó el aislamiento de linfocitos de cada muestra por medio de la siguiente técnica:

#### 7.3.3.1 Aislamiento de linfocitos de sangre periférica

1. Se obtuvo el volumen determinado de sangre
2. Se depositaron 5 ml de Histopaque 1077 (Sigma-Aldrich) previamente calentado a 37°C en un tubo de 15 ml (tubo 1)
3. Se depositaron 3 ml de medio de cultivo RPMI-1640 (Sigma-Aldrich) en otro tubo (tubo 2)
4. Se mezclaron por inversión 3 ml de sangre + 3 ml de medio de cultivo RPMI-1640 (Sigma-Aldrich) previamente calentado a 37°C en un tercer tubo
5. La mezcla del tubo 3 se depositó suavemente en el tubo 1 con ayuda de una pipeta, evitando mezclar el Histopaque 1077 con tal mezcla
6. El tubo 1 se centrifugó a 2500 rpm durante 10 minutos
7. Se desechó el sobrenadante y se recuperó el anillo de linfocitos ubicado entre la capa de suero sanguíneo y la capa de Histopaque 1077
8. Los linfocitos aislados se depositaron en el tubo 2, mismo que se centrifugó a 1500 rpm durante 10 minutos
9. Se decantó el sobrenadante y el botón celular se resuspendió en 1 ml de RPMI-1640
10. Se realizó la prueba de viabilidad con azul de tripano al 0.4%
11. Se lleva a cabo un conteo de células en una cámara de Neubauer y se ajustan a una concentración de 200 000 células/ml
12. Este proceso se repite hasta obtener la concentración celular mencionada, suficiente para llevar a cabo el experimento con todos los tratamientos propuestos



<sup>10</sup> El lavado consistió en agregar un mililitro de RPMI-1640 al tubo eppendorf, centrifugar a 3000 rpm durante cinco minutos y nuevamente agregar medio de cultivo a la suspensión celular.

2. **Tratamiento simultáneo (co-tratamiento).** Consiste en la incubación simultánea de los extractos fúngicos (cada una de las cinco concentraciones elegidas de forma

prueba de viabilidad con azul de tripano al 0.4%.

1. **Tratamiento previo (pre-tratamiento).** Consiste en la incubación de los linfocitos previamente aislados, primero con los extractos fúngicos durante dos horas a 37° C. Posteriormente se realiza un lavado<sup>10</sup>. La suspensión de linfocitos se incuba nuevamente bajo las condiciones de temperatura y tiempo ya señaladas, pero ahora con el mutágeno en la concentración elegida. Pasado este tiempo se realiza otro lavado y se efectúa la

A continuación se describe cada tipo de tratamiento.

[Extracto]					Tratamiento	Previo	Simultáneo	Posterior	Testigo extracto	Testigo negativo	Testigo positivo												
	a) 5 µl/ml	b) 10 µl/ml	c) 20 µl/ml	d) 40 µl/ml	e) 80 µl/ml	a→MMS	b→MMS	c→MMS	d→MMS	e→MMS	a+MMS	b+MMS	c+MMS	d+MMS	e+MMS	MMS→a	MMS→b	MMS→c	MMS→d	MMS→e	Linfocitos + 80 µl Extracto / ml / 2h / 37° C	Suspensión de linfocitos en RPMI 1640	Linfocitos + MMS / 2h / 37° C

Tabla 3. Tratamientos con los extractos acuosos de *Cantharellus cf. cibarius*

El diseño experimental corresponde a bloques al azar, los ensayos con los extractos se llevaron a cabo de forma independiente entre cada uno de los cinco donadores. No se realizaron réplicas para los tratamientos. La concentración final de MMS en cada cultivo celular fue de 35 µM, tal como se determinó en la fase exploratoria. Los tratamientos correspondientes se muestran en la Tabla 3.

### 7.3.3.2 Protocolos de tratamiento

eppendorf de 1.5 ml

13. Una vez obtenida la cantidad celular necesaria, ésta se separó en 18 tubos

**3. Electroforesis.** Bajo condiciones de luz amarilla, las laminillas se colocaron en una cámara de electroforesis previamente sumergida en hielo. Las laminillas se cubrieron con la solución amortiguadora de electroforesis de  $\text{pH} > 13$  durante 20 minutos para permitir el desenrollamiento del ADN. La electroforesis se realizó a 300 mA y 25 V constantes durante 20 minutos más. Las laminillas se neutralizaron dos veces con amortiguador de  $\text{pH} 7.5$ , durante 5 minutos cada lavado, se eliminó el exceso del amortiguador y se sumergieron en alcohol etílico absoluto durante 5 minutos.

**2. Preparación de la muestra.** Se colocó una capa de agarosa de bajo punto de fusión sobre un portaobjetos, donde se agregaron 75  $\mu\text{L}$  de una mezcla de agarosa de bajo punto de fusión-linfocitos tratados (75  $\mu\text{L}$ : 75  $\mu\text{L}$ ) de cada uno de los tratamientos antes mencionados, se colocó un cubreobjetos y se refrigeró a  $4^\circ\text{C}$  durante 5 minutos o más, hasta que solidificó la agarosa. Se retiró cuidadosamente el cubreobjetos y se repitió la operación anterior. Posteriormente, las preparaciones se sumergieron en solución de lisos durante 24 horas en refrigeración. Después de transcurrido este tiempo se realizó la electroforesis.

**1. Preparación de laminillas.** Se adicionó una capa delgada de agarosa regular 0.5% (180  $\mu\text{L}$ ) esparciéndose uniformemente sobre la laminilla, se colocaron sobre una superficie plana hasta que la agarosa seco. Las laminillas así preparadas se guardaron hasta su uso.

**7.3.3.3 Electroforesis unicelular en gel (ensayo cometa)**

**3. Tratamiento posterior (post-tratamiento).** Consiste en la incubación celular, de forma invertida al pre-tratamiento, es decir, primero con el mutágeno y después con los extractos de *C. cf. cibarius*. Una vez terminado el tratamiento se realizó la prueba de viabilidad correspondiente. Después de los diversos tratamientos se llevó a cabo la metodología establecida para cada ensayo.

Posteriormente se realizó la prueba de viabilidad correspondiente. independiente) con el mutágeno sobre la suspensión celular, durante dos horas a  $37^\circ\text{C}$ .



**3. Prefijación.** Lentamente se adicionó un mililitro de fijador frío (metanol-ácido acético 3:1) a cada tubo. Se agitaron suavemente y dejaron en reposo durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se centrifugaron a 1500 rpm por 10 minutos.

**2. Tratamientos.** A las 24 horas de incubación se realizaron los tratamientos. Después de los tiempos marcados, los tubos se centrifugaron a 1500 rpm durante 10 minutos, se hicieron dos lavados, se decantó el sobrenadante y se agregó solución isotónica (dos veces) y se incubó nuevamente. A las 44 horas de cultivo se agregó la citocalasina B hasta obtener una concentración final de 6 µg/ml. Los tubos se incubaron de nuevo durante 28 h más para hacer un total de 72 horas. Se centrifugaron a 1500 rpm durante 10 minutos. Se eliminó el sobrenadante y se colocaron en un agitador rotatorio, a velocidad moderada, mientras se les adicionaron 8 ml de solución hipotónica de KCl 0.075 M a 4°C. Los tubos se mantuvieron en reposo durante 3 minutos.

**1. Cultivo de linfocitos y tratamientos.** Bajo condiciones estériles se agregaron 400 µl de sangre en tubos falcon de 15 ml conteniendo 5 ml de medio de cultivo (RPMI 1640), adicionado con fitohemaglutinina (PHA) al 4%. Los tubos se incubaron a 37°C.

ml de sangre periférica, muestra que se sometió a las siguientes condiciones. Durante el proceso de estandarización de este ensayo, por punción venosa se tomaron 20

#### 7.3.3.4 Micronúcleos por bloqueo de citocinesis

células tratadas con los extractos fúngicos más MMS y C es el testigo negativo. Donde A es el grupo de células tratadas con MMS (testigo positivo), B el grupo de

$$\% \text{ Reducción} = \frac{\text{Media en A} - \text{Media en B}}{\text{Media en A}} \times 100$$

reducción de daño de acuerdo con Manoharan y Banerjee (1985):  
 las caudas de 100 cometas. Con base en los datos obtenidos se calculará el porcentaje de cuales se determinó el número de núcleos normales y cometas, además de la longitud de epifluorescencia. Se contaron un total de 100 células por cada lote de tratamiento, de las laminitas, se colocó un cubrecubjetos y se observaron con un microscopio de

- Morfológicamente idénticos al núcleo principal
- El diámetro debe encontrarse entre 1/3 y 1/16 del núcleo principal
- Son no-refractiles
- No están enlazados o conectados al núcleo principal
- No deben superlaparse con el núcleo principal
- Las membranas nucleares del micronúcleo (MN) y el núcleo principal deben ser claramente diferenciables (Fenech y cols. 2000)

siguientes criterios de identificación:  
 7. **Examen microscópico.** Se observaron 1000 células binucleadas por lote de tratamiento a 600 aumentos y se contabilizaron los micronúcleos de acuerdo con los

nuevamente se dejaron secar al aire.  
 Por último se hizo un lavado con agua corriente para eliminar el exceso de colorante y de la eficiencia de la tinción por medio de revisiones al microscopio de cada preparación. sumergieron en una solución de verde rápido al 1% por 30 a 60 segundos, dependiendo corriente y se secaron al aire. En cuanto las preparaciones estuvieron totalmente secas se Coplin conteniendo el reactivo de Schiff. Pasado este tiempo se lavaron con agua vez secas, en condiciones de oscuridad, se colocaron durante 1.5 h dentro de una caja min y después se enjuagaron con agua destilada y se dejaron secar totalmente al aire. Una Posteriormente las laminillas se transfirieron a otra solución de HCl 1N a 60° C por 10 Coplin con ácido clorhídrico 1N a temperatura ambiente por 10 minutos más. destilada a temperatura ambiente durante 10 minutos, después se introdujeron en otra caja 6. **Tinción con reactivo de Schiff.** Las laminillas se colocaron en cajas Coplin con agua

una altura aproximada de 10 cm. Las laminillas se secaron al aire.  
 5. **Preparación de laminillas.** El botón celular se resuspendió en 1.5 ml del sobrenadante conservado y se dejó caer mediante goteo sobre varios portaobjetos libres de grasa, desde

botón celular limpio.  
 4. **Fijación.** Se eliminó el sobrenadante y se les agregaron 10 ml de fijador frío. Se centrifugaron una vez más a 1500 rpm durante 10 minutos, repitiendo hasta obtener un



En este ensayo, hubo una importante variación en cuanto a la respuesta celular de los cinco donadores a los distintos tratamientos. Una particularidad de tal variación se evidenció en dos de ellos, denominados F y B, quienes mostraron una sensibilidad mayor a los tratamientos posteriores, pues al analizar las preparaciones correspondientes únicamente se registraron núcleos difusos, indicando muerte celular que coincidió con el bajo porcentaje de viabilidad. Los resultados correspondientes a ambos sujetos se presentan mas adelante. En consecuencia, estos donadores fueron excluidos del análisis estadístico, al no obtener las series de valores completas. A continuación se presentan los resultados de la prueba de Friedman aplicada a los datos de los donadores H, D y R para las variables denominadas porcentaje de viabilidad celular, porcentaje de daño al ADN celular, longitud caudal ( $\mu\text{m}$ ) de cometas por protocolo de tratamiento y porcentaje de reducción de daño al ADN celular.

### 8.1 Electroforesis unicelular en gel (ensayo cometa)

## 8. RESULTADOS

Donde M1 indica la cantidad de células mononucleadas, M2 binucleadas, M3 trinucleadas y M4 tetranucleadas (Kirsch-Volders y cols. 2003).

$$\text{IBCP} = (M1+2(M2)+3(M3+M4))/\text{número total de células}$$

Índice de bloqueo de la proliferación celular

$$\text{IDN} = (M1+2(M2)+3(M3)+4(M4))/\text{número total de células}$$

Índice de división nuclear

Los MN se reportan de dos maneras diferentes: MN totales y células binucleadas con MN. Para el primer caso se contabilizan todos los MN observados y se dividen entre el número de células contabilizadas (1000). Para la células binucleadas con MN no importa cuantos MN tuvieran se contabilizan como una unidad. Se realiza la cuantificación de ambas maneras. Adicionalmente se observan 500 células más por individuo, en las que se contabilizan la cantidad de células con un núcleo, dos núcleos, tres núcleos y cuatro núcleos. Esto con objeto de calcular los índices de división nuclear y de bloqueo de la proliferación de la citocinesis de acuerdo con las siguientes fórmulas:

### 8.1.1 Porcentaje de viabilidad celular

Los porcentajes de viabilidad de los cultivos celulares a los que se les aplicaron los tratamientos, se calcularon por medio del ensayo de exclusión por tinción con azul de tripano y se muestran en la Tabla 4. El valor más bajo de viabilidad (73%) se observó en el tratamiento posterior con 80 µl de extracto/ml de medio de cultivo, mientras que el más alto (88%) se encontró en el tratamiento simultáneo con 40 µl de extracto/ml de medio de cultivo.

Tabla 4. Porcentajes promedio de viabilidad por protocolo de tratamiento

Tratamiento	(µl de extracto fúngico/ml RPMI 1640)				
	0	5	10	20	40
Previo	-	85	86	82	81
Simultáneo	-	80	80	85	88
Posterior	-	78	79	85	79
Testigo negativo	95	-	-	-	-
Testigo positivo	86	-	-	-	-
Testigo extracto	-	-	-	-	93

Los resultados del análisis estadístico aplicado a las medianas de los valores de porcentaje de viabilidad se muestran en la Tabla 5.

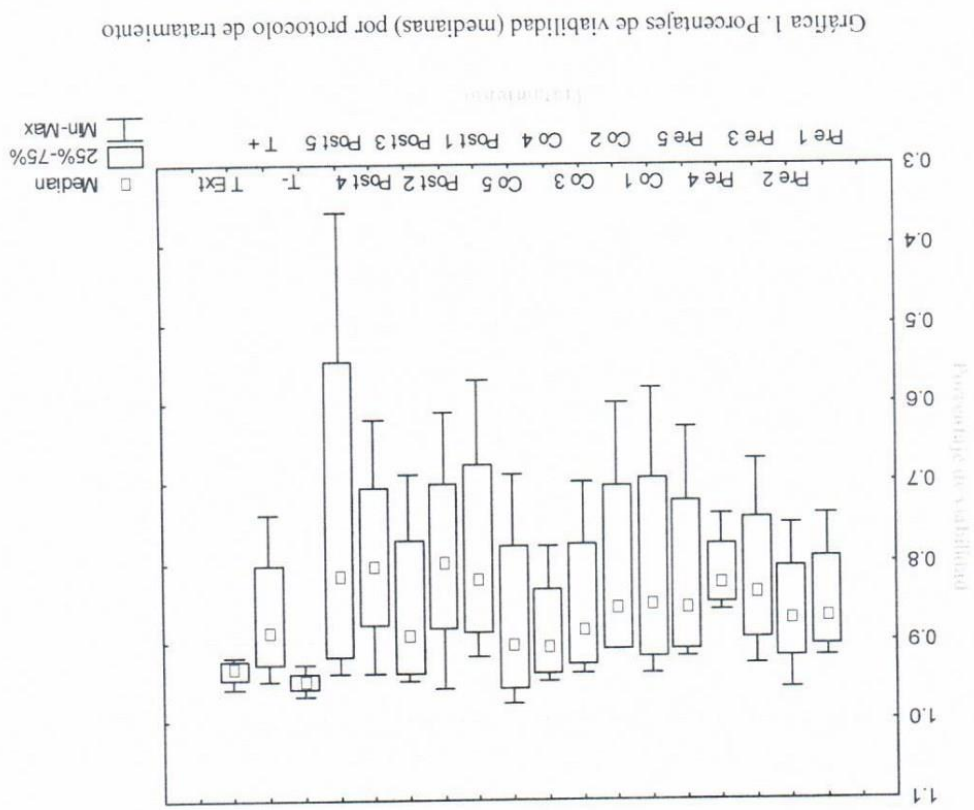
Tabla 5. Rangos asignados a los porcentajes de viabilidad de los tres protocolos de tratamiento de acuerdo con la prueba de Friedman

Tratamiento	µl de extracto fúngico /ml RPMI 1640	Rango promedio	Suma de rangos	Desviación estándar
Previo	5	8.50	25.50a	0.09
	10	12.50	37.50a	0.10
	20	6.83	20.50a	0.10
	40	5.66	17.00a	0.06
	80	7.16	21.50 <sup>b</sup>	0.16
Simultáneo	5	7.33	22.00a	0.19
	10	5.83	17.50a	0.17
	20	11.33	34.00a	0.13
	40	14.83	44.50a	0.09
	80	14.66	44.00a	0.15
Posterior	5	4.00	12.00a	0.18
	10	7.50	22.50a	0.17
	20	12.66	38.00a	0.14
	40	6.33	19.00a	0.16
	80	6.66	20.00a	0.32
Testigo negativo	-	-	44.00a	0.02
Testigo positivo	-	-	36.50a	0.11
Testigo extracto	80	12.33	37.00a	0.02

Las sumatorias de rango con la misma letra muestran la ausencia de diferencias estadísticamente significativas a un nivel de 95%



En la Gráfica 1 puede observarse que los valores con menor variación corresponden a los tratamientos de los testigos negativo y de extracto fungico (80 µl de extracto/ml de medio de cultivo). Mientras aquel con mayor amplitud de variación fue el Post-tratamiento 5 (80 µl de extracto/ml de medio de cultivo). Cabe mencionar que el testigo de extracto fungico no causó ningún tipo de citotoxicidad puesto que tanto la media como la mediana de tal grupo experimental se mantuvieron al mismo nivel del testigo negativo, mientras que el resto de los tratamientos se ubicó por debajo de éstos.



Gráfica 1. Porcentajes de viabilidad (medianas) por protocolo de tratamiento

### 8.1.2 Porcentaje de daño al ADN celular

El daño al ADN celular por protocolo de tratamiento se muestra expresado como daño promedio en porcentaje en la Tabla 6. En cuanto al nivel de daño al ADN celular, el valor que indica el valor más bajo de este tipo de daño corresponde al tratamiento simultáneo (57.66%) con (20 µl de extracto/ml de medio de cultivo) mientras que el valor más alto se encontró en el tratamiento previo (94%) con 5 µl de extracto/ml de medio de cultivo.

Tabla 6. Porcentajes promedio de daño al ADN celular por protocolo de tratamiento

Tratamiento	(µl de extracto fúngico/ml RPMI 1640)					
	0	5	10	20	40	80
Previo	-	94	91.33	84	88.66	92
Simultáneo	-	92	65.33	68.33	73.33	57.66
Posterior	-	-	76.33	71.66	68	75.33
Testigo negativo	53.66	-	-	-	-	-
Testigo positivo	71.33	-	-	-	-	-
Testigo extracto	-	-	-	-	-	64.66

Asimismo, los resultados del análisis estadístico aplicado a las medianas de los valores de porcentaje de daño al ADN se muestran en la Tabla 7.

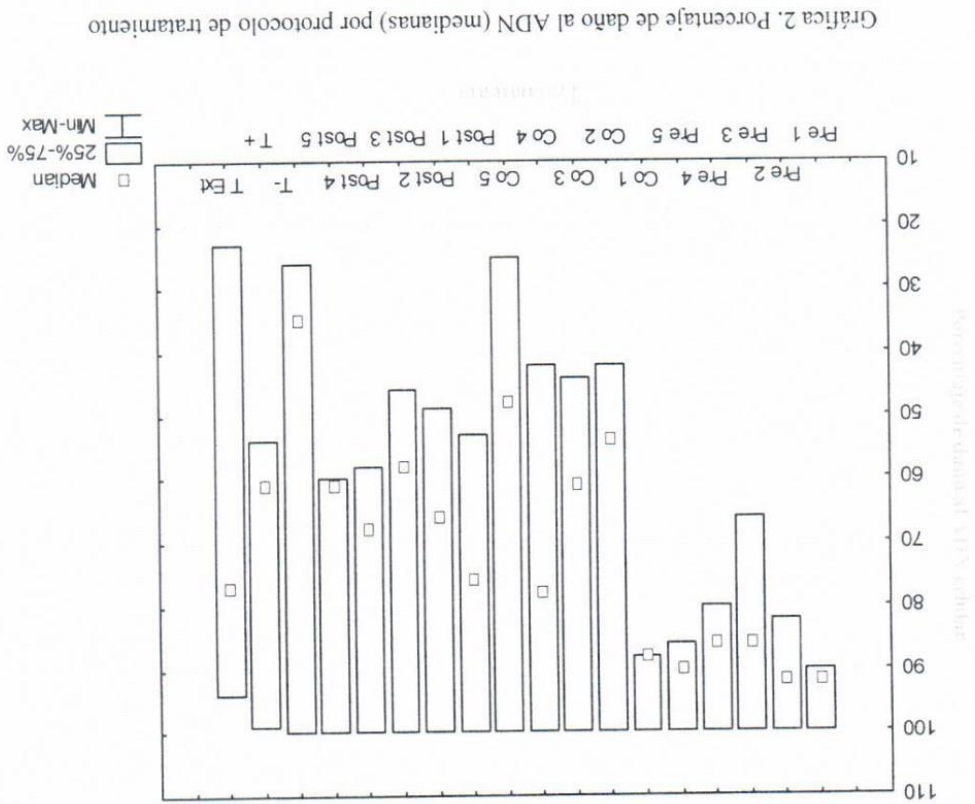
Tabla 7. Rangos asignados a los porcentajes de daño al ADN de los tres protocolos de tratamiento de acuerdo con la prueba de Friedman

Tratamiento	µl de extracto fúngico /ml RPMI 1640	Rango	promedio	Suma de rangos	Desviación estándar
Previo	5	15.33	46.00a	0.05	0.05
	10	14.00	42.00a	0.09	0.09
	20	12.00	36.00a	0.17	0.10
	40	13.00	39.00a	0.10	0.10
	80	14.00	42.00a	0.07	0.07
Simultáneo	5	14.16	42.50a	0.06	0.06
	10	6.66	20.00a	0.30	0.30
	20	7.33	22.00a	0.28	0.28
	40	9.00	27.00a	0.29	0.29
	80	5.16	15.50a	0.38	0.38
Posterior	5	9.16	27.50a	0.23	0.23
	10	8.66	26.00a	0.25	0.25
	20	7.66	23.00a	0.28	0.28
	40	10.00	30.00a	0.21	0.21
	80	9.33	28.00a	0.22	0.22
Testigo negativo	-	4.83	14.50a	0.40	0.40
	-	6.33	19.00a	0.24	0.24
	80	4.33	13.00a	0.37	0.37
Testigo positivo	-	6.33	19.00a	0.24	0.24
	-	4.33	13.00a	0.37	0.37
	80	4.33	13.00a	0.37	0.37
Testigo extracto	-	6.33	19.00a	0.24	0.24
	-	4.33	13.00a	0.37	0.37
	80	4.33	13.00a	0.37	0.37

Las sumatorias de rango con la misma letra muestran la ausencia de diferencias estadísticamente significativas a un nivel de 95%



En la Gráfica 2 se observa la dispersión de los datos correspondientes a los porcentajes de daño al ADN celular registrados para cada lote de tratamiento, donde aquellos de tratamiento previo muestran una variación menor, sin embargo las medianas de éstos mostraron una tendencia hacia los mayores porcentajes de daño. Cabe mencionar que en el testigo de Extracto fúngico no se encontraron valores de totalidad de porcentaje de daño celular, aunque de forma llamativa el testigo positivo compartió la misma peculiaridad. En cuanto al lote de testigo negativo, como se esperaba, presentaron los valores promedio más bajos de porcentaje de daño al ADN.



### 8.1.3 Longitud caudal ( $\mu\text{m}$ ) de cometas por protocolo de tratamiento

En la Tabla 8 se muestran los valores promedio de longitud caudal (expresados en  $\mu\text{m}$ ) de los cometas encontrados en las preparaciones de este ensayo. La menor longitud caudal media se encontró en el tratamiento previo con 5  $\mu\text{l}$  de extracto/ml de medio de cultivo (94.88  $\mu\text{m}$ ) mientras que el valor más alto corresponde al tratamiento posterior (176.90  $\mu\text{m}$ ) con 40  $\mu\text{l}$  de extracto/ml de medio de cultivo.

Tabla 8. Porcentajes promedio de longitud caudal por tratamiento

Tratamiento	( $\mu\text{l}$ de extracto fúngico/ml RPMI 1640)				
	0	5	10	20	40
Previo	94.88	115.58	146.64	148.2	144.3
Simultáneo	-	128.24	147.36	130.00	106.24
Posterior	-	120.5	138.29	151.63	176.90
Testigo negativo	133.55	-	-	-	-
Testigo positivo	161.98	-	-	-	-
Testigo extracto	-	-	-	-	129.496

Los resultados del análisis estadístico aplicado a las medianas de los valores de porcentaje de daño al ADN se muestran en la Tabla 9.

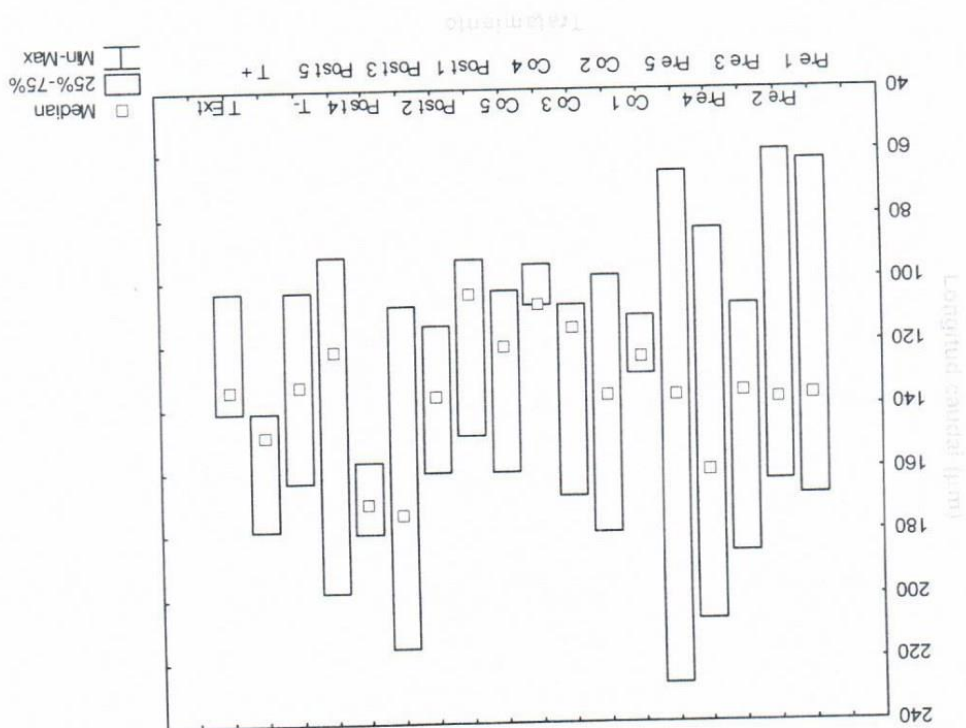
Tabla 9. Rangos asignados a la longitud caudal ( $\mu\text{m}$ ) de cometas por protocolo de tratamiento de acuerdo con la prueba de Friedman

Tratamiento	$\mu\text{l}$ de extracto fúngico/ml RPMI 1640	Rango promedio	Suma de rangos	Desviación estándar
Previo	5	7.66	23.00a	54.25
	10	7.66	23.00a	53.80
	20	10.00	30.00a	39.55
	40	10.83	32.50a	62.40
	80	9.66	29.00a	81.21
Simultáneo	5	7.00	21.00a	9.32
	10	10.66	32.00a	40.82
	20	10.00	30.00a	32.76
	40	4.66	14.00a	7.62
	80	9.50	28.50a	29.46
Posterior	5	6.33	19.00a	29.25
	10	10.33	31.00a	23.40
	20	14.00	42.00a	54.44
	40	15.00	45.00a	11.44
	80	9.00	27.00a	54.41
Testigo negativo	-	8.16	24.50a	30.00
	-	12.66	38.00a	19.73
Testigo extracto	80	7.83	23.50a	20.41
	-	-	-	-

Las sumatorias de rango con la misma letra muestran la ausencia de diferencias estadísticamente significativas a un nivel de 95%



Gráfica 3. Longitud caudal (µm) por protocolo de tratamiento



En la Gráfica 3 se observa la distribución de los valores de longitud caudal de los cometas analizados por microscopía de epifluorescencia. Los tratamientos previos muestran las variaciones de mayor amplitud con respecto a las medianas. Es notable que la mayoría de las medianas de los tratamientos simultáneos se ubicaran por debajo de las medianas del propio testigo negativo. Asimismo en la gráfica es posible apreciar que de forma inesperada, las medianas y varios valores de los tratamientos previo 4 (40 µl de extracto fungico/ml de medio de cultivo) y posteriores 3 y 4 (20 y 40 µl de extracto fungico/ml de medio de cultivo) se ubicaron por encima del testigo positivo.

#### 8.1.4 Porcentaje de reducción de daño al ADN

Los valores de porcentaje promedio de daño al ADN de los cultivos celulares sometidos a los protocolos de tratamiento se muestran en la Tabla 10. Estos se calcularon con la fórmula propuesta por Manoharan y Banerjee (1985): media en A-media en B/media en A-media en Cx100, donde A es el testigo positivo, B los tratamientos y C el testigo negativo. El menor porcentaje de reducción de daño (15.35%) se encontró en el tratamiento previo con 20 µl de extracto/ml de medio de cultivo, mientras que el mayor porcentaje de reducción de daño corresponde al tratamiento simultáneo (207.03%) con 40 µl de extracto/ml de medio de cultivo. Los valores con signo negativo indican que no hubo reparación de daño.

Tabla 10. Porcentajes promedio de reducción de daño al ADN celular por protocolo de tratamiento

(µl de extracto fúngico/ml RPMII 1640)	Tratamiento			
	5	10	20	40
Tratamiento	55.80	73.00	15.35	-89.42
Tratamiento previo	133.29	110.01	159.57	207.03
Tratamiento simultáneo	117.50	-47.11	-115.23	-104.34
Tratamiento posterior				189.09

Las medianas de los valores calculados como porcentajes de reducción de daño al ADN fueron analizadas con la prueba de Friedman. Los resultados se muestran en la Tabla 11.

Tabla 11. Rangos asignados a los porcentajes de reducción de daño al ADN por protocolo de tratamiento de acuerdo con la prueba de Friedman

µl de extracto fúngico/ml RPMII 1640	Tratamiento previo			Tratamiento simultáneo			Tratamiento posterior		
	Rango promedio	Suma de rangos	DE	Rango promedio	Suma de rangos	DE	Rango promedio	Suma de rangos	DE
5	11.16	33.50a	6.00	18.00a	183.92	7.00	21.00a	349.72	3.49
10	12.33	37.00a	7.66	23.00a	246.69	4.00	12.00a	177.01	1.77
20	6.33	19.00a	9.66	29.00a	200.72	6.16	18.50a	608.85	6.08
40	8.83	26.50a	12.00	36.00a	239.66	4.33	13.00a	265.49	2.65
80	7.33	22.00a	8.83	26.50a	194.29	8.33	25.00a	271.02	2.71

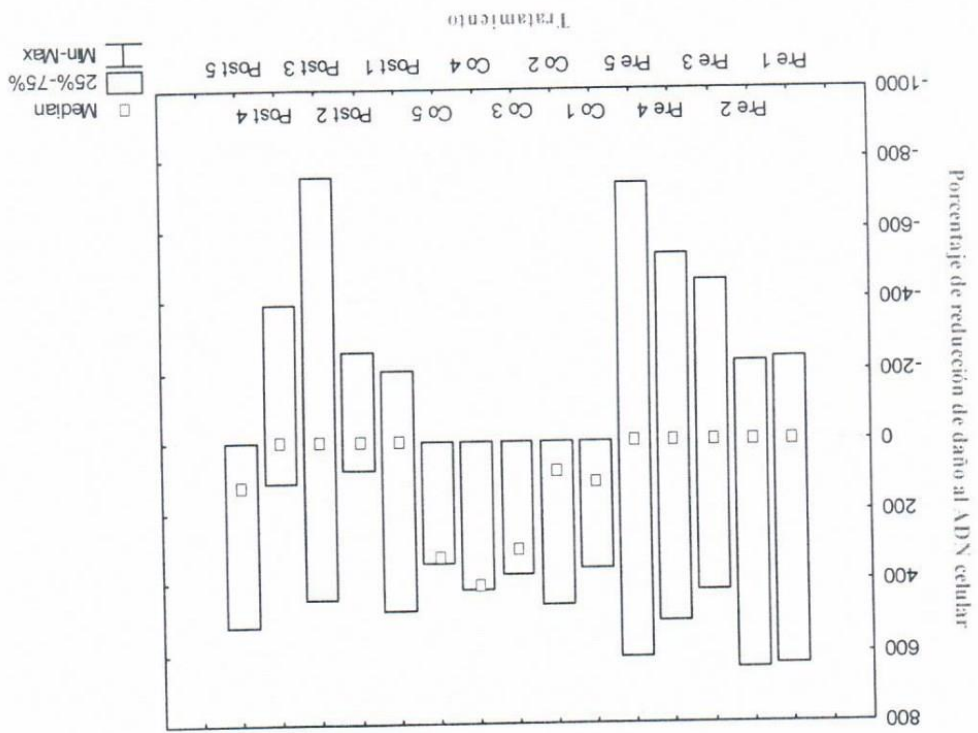
Las sumatorias de rango con la misma letra muestran la ausencia de diferencias estadísticamente significativas a un nivel de 95%

En la Gráfica 4 se muestra la dispersión de los datos expresados como porcentaje de reducción de daño al ADN celular para cada protocolo de tratamiento. De forma general



Los datos obtenidos para cada una de las variables evaluadas se analizaron con la prueba de Friedman, con la cual no se encontraron diferencias significativas entre ninguno de los tratamientos, implicando que todos tienen el mismo efecto sobre el sistema de prueba utilizado. Por lo tanto, con el fin de analizar los datos de forma complementaria, aplicando análisis para los valores de longitud caudal de los cometas para cada uno de los donadores H, D y R, debido a la importante variación encontrada en cuanto a la respuesta de éstos a los distintos tratamientos. Como se había mencionado con anterioridad, una particularidad de tal variación se evidenció en dos de los cinco donadores, denominados F y B, quienes también se excluyeron del análisis individual al obtener series incompletas de datos. En este sentido, para el análisis individual se utilizó la prueba de ANOVA para

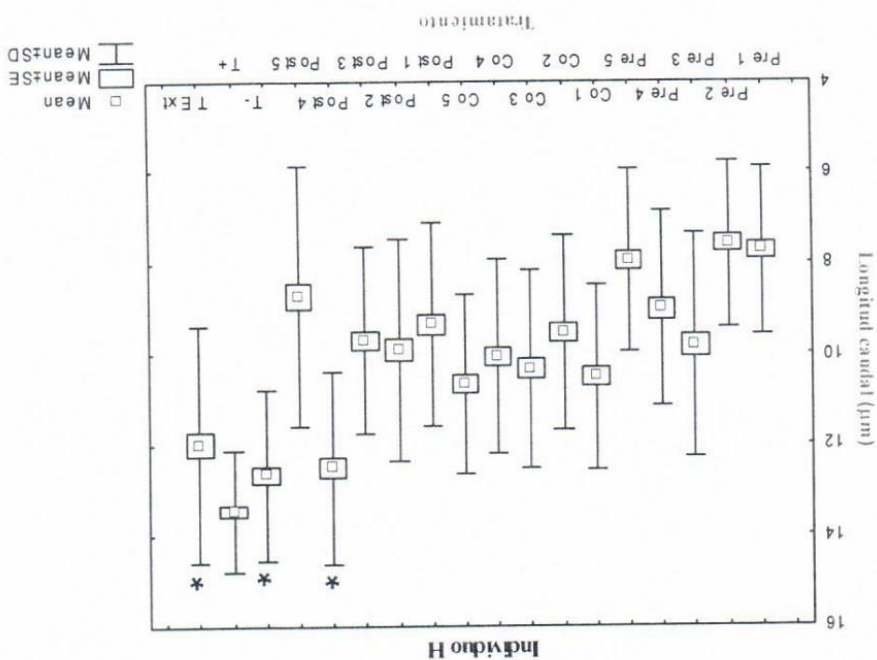
Gráfica 4. Porcentaje de reducción de daño al ADN celular por protocolo de tratamiento



puede observarse que los tratamientos simultáneos mostraron los valores más altos de reducción de daño en comparación con los tratamientos previos y posteriores. En caso de los tratamientos simultáneos, puede observarse que la mayoría de éstos se ubican de manera muy cercana alrededor de las medianas correspondientes. Mientras que los tratamientos con mayor dispersión de datos con respecto a la mediana son aquellos de los tratamientos previo y posterior.

Como se aprecia en la gráfica anterior en este individuo se encontraron altos valores de longitud caudal en el testigo negativo, sugiriendo un daño basal importante. Estos valores son mayores tanto en comparación con todos los protocolos de tratamiento llevados a cabo como con los donadores D y R, también analizados individualmente. Cabe mencionar que la mayoría de los tratamientos previos se caracterizaron por presentar las medias de longitud caudal más bajas con respecto al resto de los grupos experimentales.

Gráfica 5. Las marcas indican los grupos sin diferencias estadísticamente significativas con respecto al Testigo negativo cuando  $p < 0.05$  de acuerdo con la prueba de Tukey.



Longitud caudal (µm) por protocolo de tratamiento

**8.1.5 Longitud caudal de Cometas por protocolo de tratamiento por individuo**  
**Individuo H.** De acuerdo con los análisis estadísticos la mayoría de los tratamientos presentaron diferencias estadísticamente significativas con respecto al testigo negativo, salvo el tratamiento posterior y testigo de extracto fúngico, representados en la Gráfica 5 como Post 4 (40 µl de extracto/ml de medio de cultivo) y T Ext (80 µl de extracto/ml de medio de cultivo respectivamente).

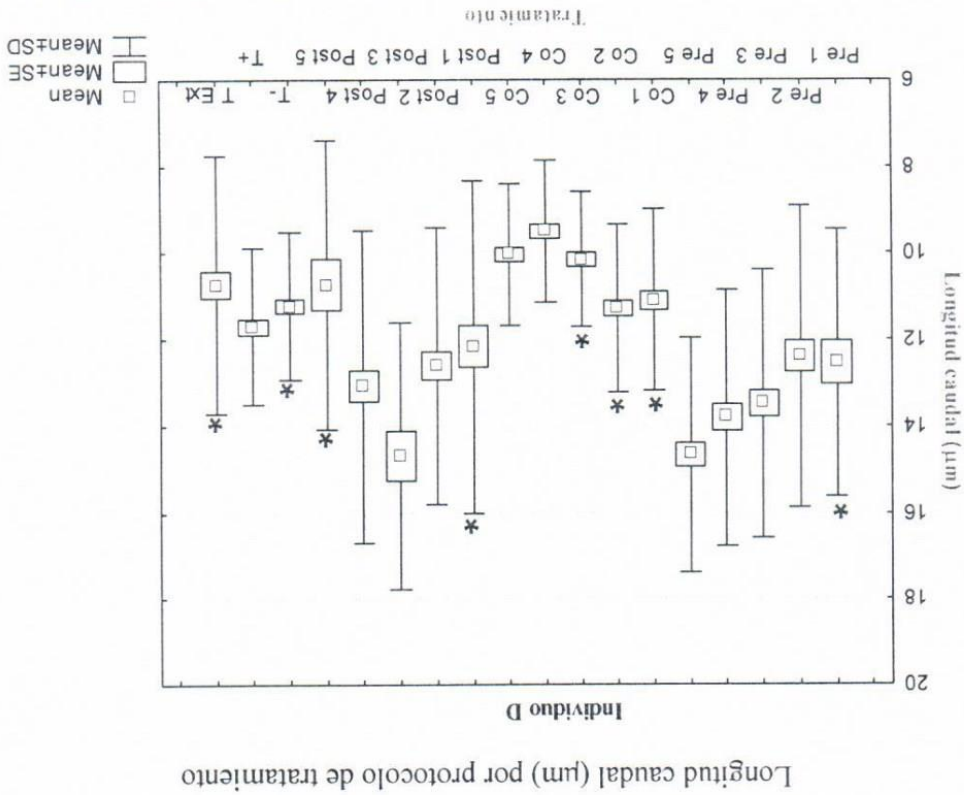
los datos de longitud caudal transformados con la función de raíz cuadrada, seguida de comparaciones múltiples de Tukey, como se muestra a continuación.



**Individuo R.** De manera similar a los casos anteriores, la mayoría de los tratamientos presentaron diferencias estadísticamente significativas con respecto al medio de cultivo), simultáneo 4 (40 µl de extracto/ml de medio de cultivo), el posterior 1

En caso del individuo D, las medias menores se encontraron en los tratamientos simultáneos, la mayoría de éstos incluso por debajo de la media del testigo negativo. Mientras que los tratamientos previos y posteriores mostraron una tendencia opuesta.

Gráfica 6. Las marcas indican los grupos sin diferencias estadísticamente significativas con respecto al Testigo negativo cuando  $p < 0.05$  de acuerdo con la prueba de Tukey.

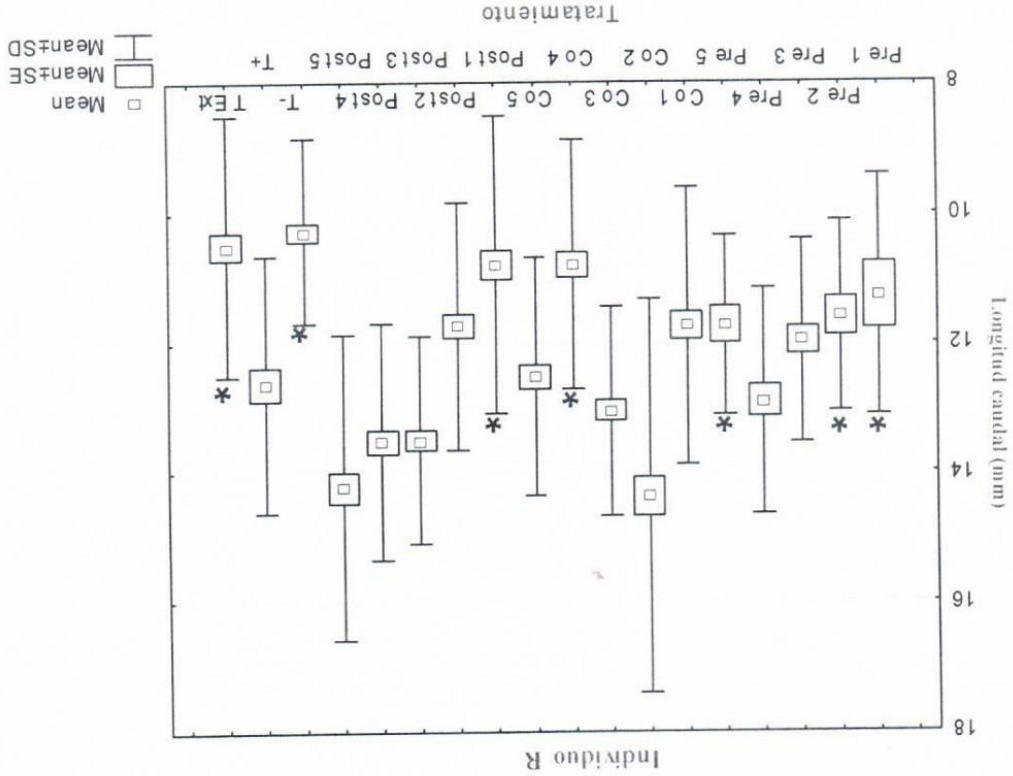


**Individuo D.** De forma similar al individuo H, en este caso se encontró que la mayoría de los tratamientos presentaron diferencias estadísticamente significativas con respecto al testigo negativo, con excepción de los tratamientos previo 1 (5 µl de extracto/ml de medio de cultivo), simultáneos 1, 2 y 3 (5, 10 y 20 µl de extracto/ml de medio de cultivo) y los posteriores 1 y 5 (5 y 80 µl de extracto/ml de medio de cultivo), así como el testigo de extracto fúngico, todo esto representado en la Gráfica 6.

A continuación se muestra una breve revisión de los resultados registrados para los donadores excluidos, denominados individuo B y F.

**Individuo B.** Se encontró consistencia entre la viabilidad para cada tratamiento y las preparaciones fijas del ensayo, debido a que en los tratamientos posteriores se encontraron los valores más bajos al comparar con el resto de los protocolos experimentales, tal como se muestra en la Tabla 12, coincidiendo con la ausencia de células viables para medición.

Gráfica 7. Las marcas indican los grupos sin diferencias estadísticamente significativas cuando  $p < 0.05$  con respecto al Testigo negativo de acuerdo con la prueba de Tukey.

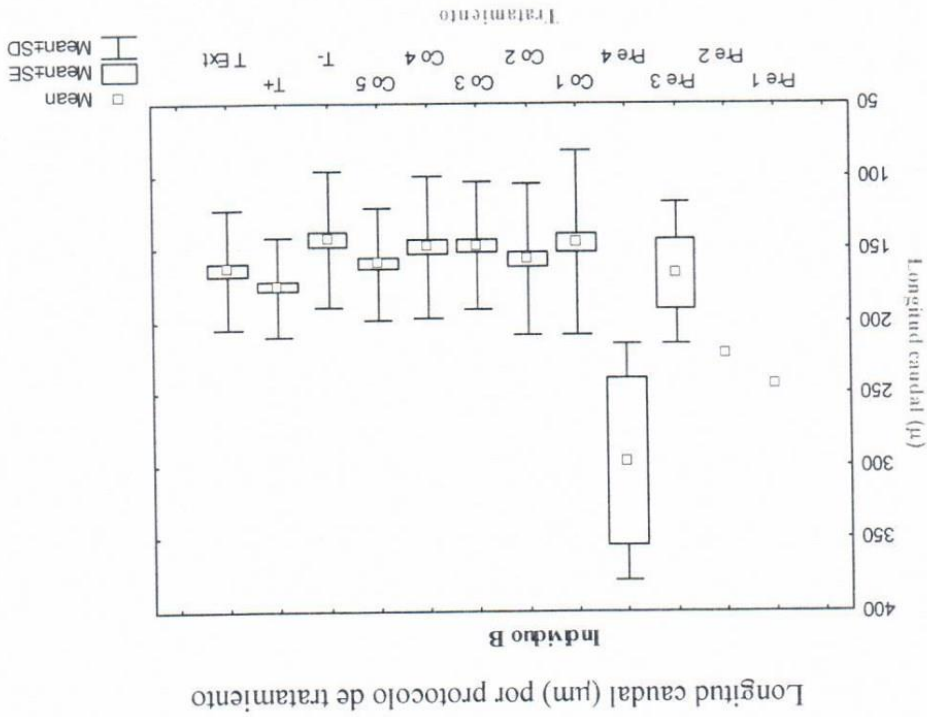


Longitud caudal (µm) por protocolo de tratamiento

(5 µl de extracto/ml de medio de cultivo) y finalmente el testigo con extracto fúngico. Lo anterior se muestra en la Gráfica 7. Puede observarse que la media del grupo testigo negativo fue la menor de todos los protocolos experimentales e incluso la menor de los tres sujetos (H, D y R) analizados de forma individual.



Individuo F. De forma similar al individuo B, se observó una sensibilidad importante a los protocolos aplicados, pues en los tratamientos posteriores sólo se registraron núcleos difusos, coincidiendo nuevamente con los valores más bajos de viabilidad celular

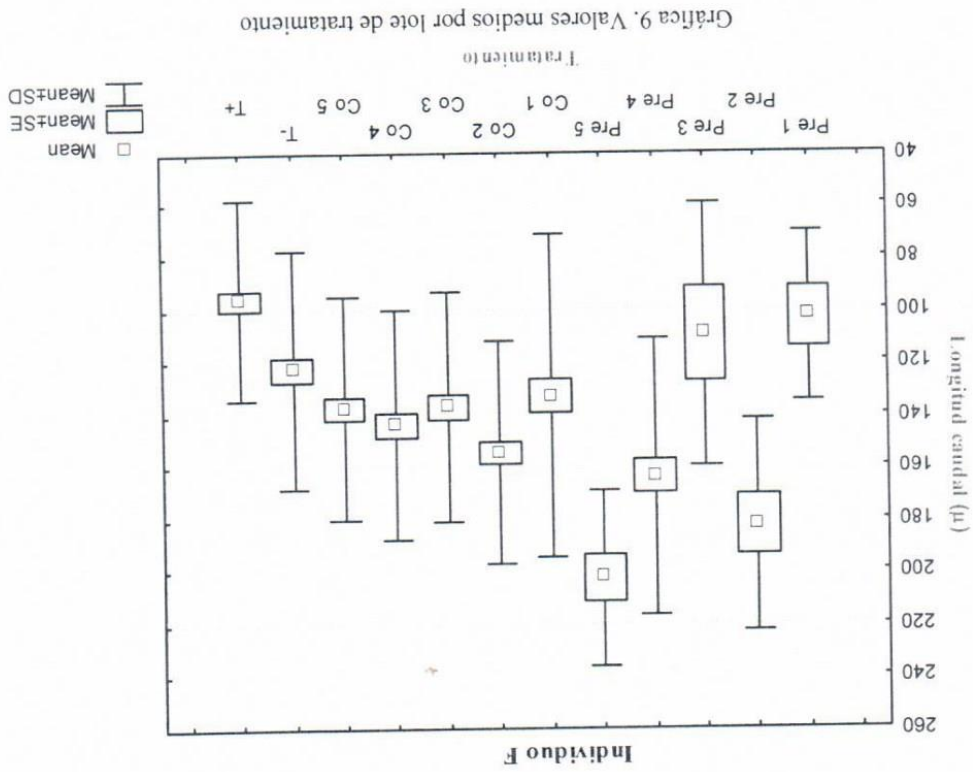


En el caso de este donador se observó una sensibilidad mayor a los tratamientos ya que en algunos de ellos no se encontraron células aptas para medición pues sólo se registraron núcleos difusos, principalmente en todos los posteriores y el tratamiento previo con 80 µl de extracto/ml de medio de cultivo. En el resto de los pre-tratamientos representados como Pre 1, 2, 3 y 4 sólo se encontraron 1, 4 y 2 células, respectivamente. Es de notarse que para este individuo, el lote testigo de extracto mostró un valor medio menor al del propio testigo negativo.

Testigo	Tratamiento (µl de extracto fungico/ml RPMI 1640)					
	0	5	10	20	40	80
Previo	-	76	66	77	72	68
Simultáneo	-	55	59	68	62	62
Posterior	-	37	44	28	39	31
Testigo negativo	98	-	-	-	-	-
Testigo positivo	69	-	-	-	-	-
Testigo extracto	-	-	-	-	-	97

Tabla 12. Porcentajes de viabilidad por protocolo de tratamiento

Como puede observarse en la Gráfica 9, en este caso tampoco se observó una tendencia clara con respecto a los tratamientos previos mientras que los simultáneos mantuvieron cierta estabilidad. De forma interesante, el grupo de testigo positivo mostró una media por debajo de aquella del grupo de testigo negativo. Mientras que la mayoría de las medias del resto de los tratamientos se ubicó por encima del testigo negativo, salvo los



Longitud caudal por protocolo de tratamiento

Tratamiento	(µl de extracto fúngico/ml RPMI 1640)					
	0	5	10	20	40	80
Previo	-	87	84	84	80	92
Simultáneo	-	79	87	91	89	85
Posterior	-	3	36	61	81	20
Testigo negativo	-	-	-	-	-	-
Testigo positivo	-	-	-	-	-	-
Testigo extracto	-	-	-	-	-	-

Tabla 13. Porcentajes de viabilidad por protocolo de tratamiento

Tabla 13.

evaluados después de la aplicación de los diferentes protocolos, tal como se muestra en la



tratamientos previos, representados como Pre 1 y Pre 3 (con 5 y 20 µl de extracto/ml de

medio de cultivo, respectivamente).

### 8.2 Micronúcleos por bloqueo de citocinesis

Durante la estandarización de este ensayo no se obtuvo la inducción de micronúcleos esperada, por tanto, con base en las observaciones de los ensayos con 72 horas totales de cultivo se planteó la necesidad de modificar tales tiempos puesto que los índices calculados sugirieron un arresto en la proliferación celular, por lo que se llevaron a cabo otros ensayos de mayor duración con el fin de observar si tal arresto cesaba al permitir a las células continuar proliferando. Los tiempos de cultivo evaluados fueron a 72, 78 y 96 horas. En la Tabla 14 se muestran los valores de MN, IDN e IBPC calculados para los tratamientos con mutágeno a 2 y 4 horas con tiempo total de cultivo de 72 horas a partir de cultivos celulares de dos donadores representados por los incisos a y b, sobre los cuales se probaron diversas concentraciones de mutágenos (MMS y MMC).

Tabla 14. MN Micronúcleos, IDN Índice de División Nuclear e IBPC Índice de Bloqueo de

Proliferación Celular de los cultivos con cosecha a 72 horas y tratamientos con mutágeno de 2 y 4 horas de incubación

Tratamiento	2 horas			4 horas		
	MN	IDN	IBPC	MN	IDN	IBPC
Testigo negativo (a)	1	2.019	1.958	0	1.554	1.54
Testigo negativo (b)	0	1.588	1.554	1	1.54	1.538
10 ng MMC (b)	0	1.4	1.388	0	1.698	1.686
20 ng MMC (b)	0	1.704	1.686	0	1.666	1.662
20 ng MMC (a)	0	1.157	1.153	1	1.121	1.121
40 ng MMC (a)	0	1.145	1.145	0	1.112	1.112
80 ng MMC (b)	0	1.298	1.298	0	1.62	1.618
3.5x10 <sup>-5</sup> MMS (a)	1	2	1.992	1	1.652	1.664
4x10 <sup>-5</sup> MMS (a)	1	1.796	1.782	2	1.682	1.664
7x10 <sup>-5</sup> MMS (a)	0	1.882	1.836	0	2.035	1.927
8x10 <sup>-5</sup> MMS (a)	1	1.55	1.538	0	1.592	1.566
2x10 <sup>-4</sup> MMS (b)	0	1.51	1.504	0	1.544	1.544
4x10 <sup>-4</sup> MMS (b)	0	1.458	1.45	0	1.48	1.48
8x10 <sup>-4</sup> MMS (b)						
Sin células						

MMC Mitomicina C, MMS Metil metanosulfonato.

Finalmente se probó una modificación más de tiempo total de incubación para los cultivos celulares con las mismas condiciones en cuanto a concentración y tiempos de tratamiento con mutágenos (MMC y MMS) con el fin de observar si con esta extensión de tiempo de incubación se encontraba una mayor ocurrencia de MN. En la Tabla 16 se muestran los resultados correspondientes al último ensayo de micronúcleos, donde nuevamente se presenta la ausencia de células en el lote de prueba de MMS, reafirmando que la concentración y tiempo de exposición al mutágeno derivó en actividad citotóxica.

MMC Mitomicina C, MMS Metil metanosulfonato

Tratamiento	2 horas			4 horas		
	MN	IDN	IBPC	MN	IDN	IBPC
Testigo negativo	0	1.872	1.84	1	1.704	1.688
MMC 10 ng	2	1.178	1.724	4	1.898	1.866
4 x 10 <sup>-4</sup> M MMS	Sin células			Sin células		

Tabla 15. MN Micronúcleos, IDN Índice de División Nuclear e IBPC Índice de Bloqueo de Proliferación Celular de los cultivos con cosecha a 72 horas y tratamientos con mutágenos de 2 y 4 horas de incubación

A partir de los primeros ensayos con tiempo total de incubación celular de 72 horas, donde no se obtuvo evidencia de una inducción significativa de micronúcleos, se experimentó con un tiempo total de cultivo de 78 horas. Los resultados de este ensayo se muestran en la Tabla 15. Se observa un ligero arresto celular en los tratamientos, incluso en el testigo negativo, aunque en el tratamiento de MMC a concentración de 10 ng se obtuvo la mayor frecuencia de micronúcleos, comparando con todos los ensayos llevados a cabo, además los IDN e IBPC no resultaron muy bajos, incluso fueron ligeramente mayores al del testigo negativo. Sin embargo, las preparaciones fijas a partir de los grupos tratados con el mutágeno modelo de este trabajo (MMS) no pudieron analizarse debido a la ausencia de células, posiblemente por lisis debido a la citotoxicidad de las concentraciones utilizadas.



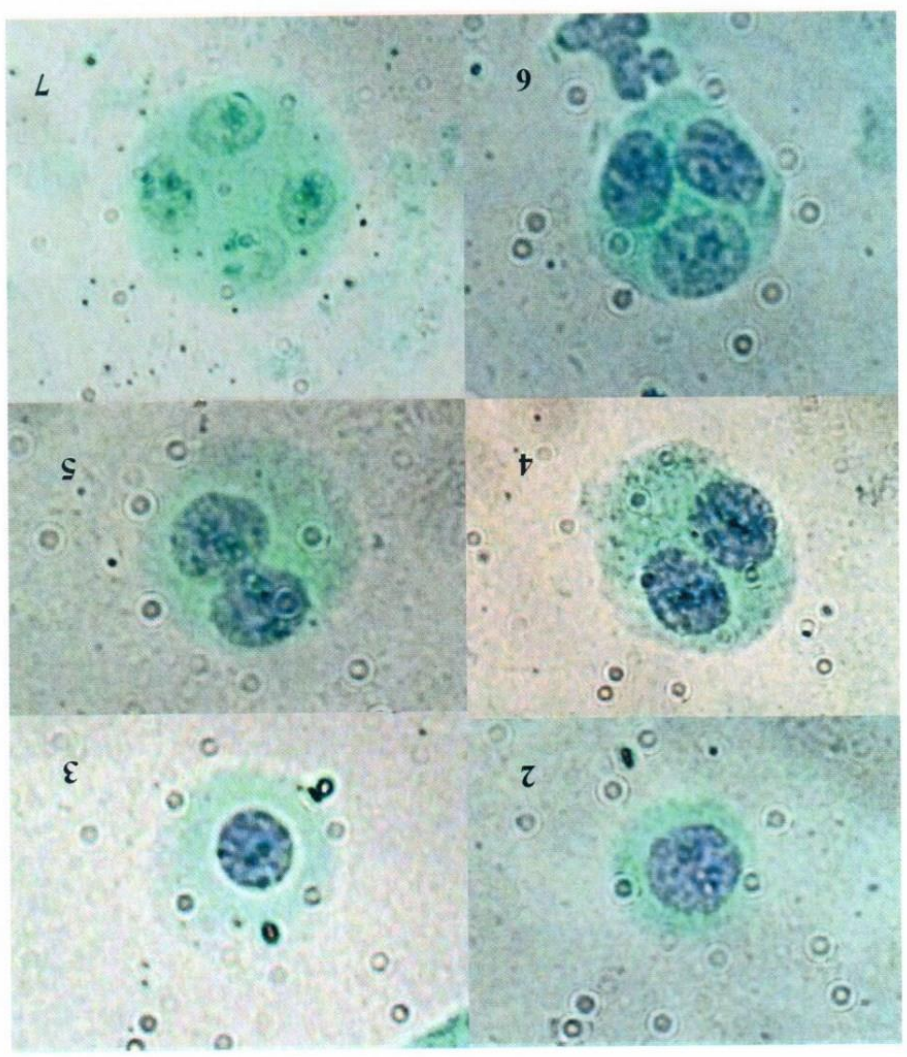
Las figuras 2-7 muestran los linfocitos mono, bi, tri y tetranucleados, de interés para calcular los índices de división nuclear (IDN) e índices de bloqueo de proliferación celular (IBPC). En las figuras 8 y 9 pueden apreciarse dos ejemplos de los micronúcleos encontrados en los ensayos de esta prueba.

MMC Mitomicina C. MMS Metil metanosulfonato

Tratamiento		MN	IDN	IBPC	MN	IDN	IBPC
Testigo negativo		1	2.096	1.968	0	1.96	1.906
10 ng MMC		1	1.932	1.866	0	2.046	1.968
4x10 <sup>-4</sup> MMS		Sin células					
2 horas				4 horas			

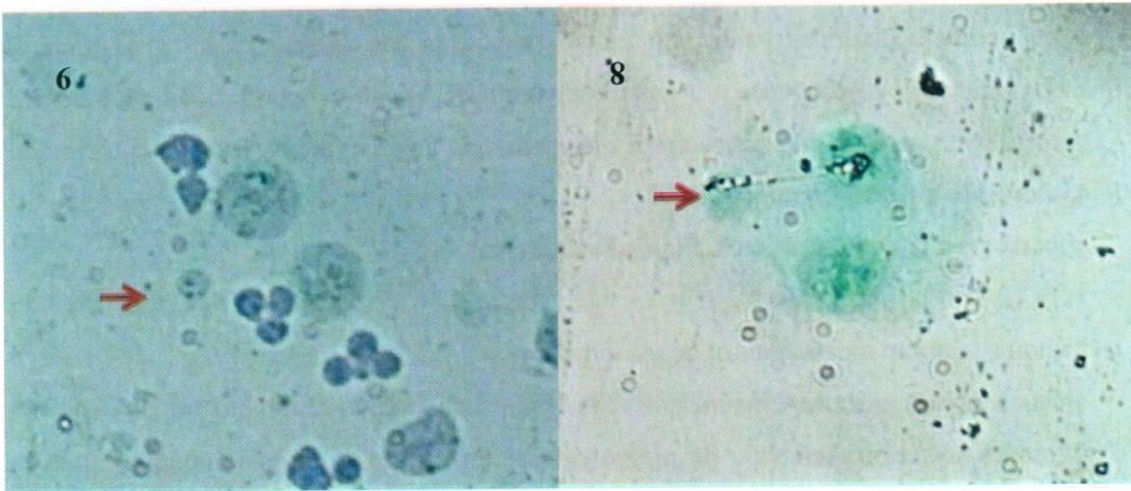
Tabla 16. MN Micronúcleos, IDN Índice de División Nuclear e IBPC Índice de Bloqueo de Proliferación Celular

Figuras 2-7. Linfocitos mono, bi, tri y tetranucleados encontrados en las preparaciones fijas realizadas a partir de los cultivos celulares de los diversos tratamientos aplicados. Figuras 2 y 3. Células mononucleadas. Figuras 4 y 5. Células binucleadas. Figura 6. Célula trinucleada. Figura 7. Célula tetranucleada.





Figuras 8 y 9. Micronúcleos encontrados en las preparaciones fijas realizadas a partir de los cultivos celulares de los diversos tratamientos aplicados.



## 9. DISCUSIÓN

El proceso metodológico de los ensayos citogénéticos utilizados resultó de una dificultad mayor a la esperada, por lo que bajo las condiciones en que se desarrolló este trabajo lo sitúan como un estudio preliminar que constituye los primeros antecedentes para estudios de evaluación de metabolitos secundarios de origen fúngico por medio de este tipo de biomarcadores de daño genético, así como del uso de tipos celulares de origen humano *in vitro*.

En cuanto al ensayo de micronúcleos por bloqueo de citocinesis, se decidió detener el proceso de estandarización en las pruebas piloto debido a las dificultades que representó el agente mutagénico seleccionado y probablemente también las particularidades del sistema de prueba. La continuación de esta parte del trabajo se retomará posteriormente, con un diseño experimental menos ambicioso para facilitar el alcance de los objetivos planteados, pues lo demandante y complejo de este tipo de estudios requiere mayor control de los múltiples factores involucrados.

### Electroforesis unicelular en gel (ensayo cometa)

#### Porcentaje de viabilidad celular

La variación de cada uno de los cinco donadores fue notable, incluso dos de ellos fueron excluidos de los análisis al no haber obtenido las series de datos completas en los tratamientos posteriores. La particularidad compartida por éstos sugiere que las células sometidas a dichos tratamientos experimentaron muerte celular, puesto que todas aquellas encontradas en las preparaciones fueron núcleos difusos o nubes, además los porcentajes de viabilidad celular de los lotes de tratamiento de ambos donadores fueron los menores al compararlos con el resto de los tratamientos e incluso al compararlos entre el mismo donador. En caso del resto de los individuos se observó respuesta a los tratamientos, sin embargo, el análisis estadístico no mostró diferencia significativa alguna, incluso entre los grupos de testigo positivo y negativo. Los resultados muestran que la mayor concentración de extracto utilizada no representa ningún riesgo de citotoxicidad. Al respecto no se observó una relación dosis-respuesta, por lo que sería recomendable ampliar el rango de concentraciones de extracto fúngico utilizadas.



En general, puede decirse que la muestra ( $n = 5$  individuos) resultó demasiado pequeña, esta situación se acentuó al reducir la sensibilidad de los individuos B y F, mencionada con anterioridad. Aunado a esto, la gran variación observada en la respuesta celular entre todos los donadores impidió la detección de diferencias estadísticamente significativas entre los diversos tratamientos aplicados. En el ANOVA aplicado de forma individual no se encontró consistencia en cuanto a la respuesta a los tratamientos por lo que se podría pensar que los datos obtenidos corresponden a una respuesta aleatoria. En el caso del individuo H, caracterizado por mostrar el mayor daño basal, sólo el tratamiento posterior con 40  $\mu$ l de extracto/ml de

extratos de *Agaricus blazei* en células V79.

trabajo de Menoli y cols. (2001), donde se evaluó la actividad antimutagénica de extractos fúngicos en el rango de concentraciones probadas tal como se encontró en la reducción del daño causado por MMS relevante estadísticamente en presencia de los aumentada con el uso de MMS al comparar con el Testigo negativo, no ocurrió una pero sobre todo para estudios posteriores. Aunque la migración del ADN fue claramente revisión posterior determinando *tail moment* de las mismas preparaciones aquí reportadas más precisa entre los tipos de Cometas observados por lo que sería recomendable una embargo, la forma de medición empleada en este trabajo no permite hacer una distinción pequeñas. Se ignora cuál de estas dos características corresponde con un daño mayor, sin longitudes, otros presentaron fragmentos de gran tamaño en longitudes caudales fitas. Algunos de éstos se formaban por fragmentos muy pequeños de ADN y grandes detectaron diferencias en cuanto al tipo de Cometas encontrados en las preparaciones En caso de esta variable, es preciso mencionar que al realizar el análisis microscópico se

#### Longitud caudal ( $\mu$ m) de Cometas por protocolo de tratamiento

Tomando en cuenta los valores promedio de tres individuos con respecto a esta variable, los menores porcentajes de daño se observaron en los tratamientos simultáneos, lo que sugiere actividad desmutagénica por medio de alguna inactivación o interacción química entre los compuestos contenidos en el extracto acuoso crudo de *Cantharellus* cf. *cibarius* probado a cinco diferentes concentraciones en este trabajo. Sin embargo, el análisis estadístico no permitió encontrar diferencias entre los tratamientos.

#### Porcentaje de daño al ADN celular

medio de cultivo y el testigo del extracto mostraron diferencias estadísticamente significativas al comparar con el testigo positivo. Para el caso de los individuos D y R, al menos uno de todos los protocolos aplicados mostraron un efecto sobre el daño causado al ADN de éstos, sin observar una relación entre la concentración de extracto fúngico utilizado y la disminución del daño, tal como se reportó en el trabajo de Oliveira y cols. (2002), Luiz y cols. (2003) y Bellini y cols. (2003) (en Gutierrez y cols. 2004) donde tampoco se detectaron efectos protectores de los extractos acuosos y por lo tanto fueron finalmente considerados como independientes de la dosis en los ensayos de antimutagenicidad, aunque tal investigación se llevó a cabo con extractos de *Agaricus blazei* y células V79 como sistema de prueba.

Se conoce un solo trabajo realizado por Park y cols. (2005) con cultivos de linfocitos humanos para evaluar la antigenotoxicidad fúngica. En este caso el hongo de interés fue *Inonotus obliquus* y el mutágeno empleado fue peróxido de hidrógeno, donde fue posible encontrar evidencia de la capacidad antigenotóxica de los extractos de este hongo, aún cuando sólo se contó con dos donadores. Con base en lo encontrado en nuestro trabajo, nos resulta interesante que con un tamaño de muestra tan reducido y la variabilidad ya conocida del sistema de prueba se alcanzara tal conclusión, aunque cabe señalar que el tipo de análisis estadístico aplicado fue diferente, mismo que consideramos inadecuado.

**Porcentaje de reducción de daño al ADN**

Los valores promedio más altos de reducción de daño al ADN celular se observaron en los tratamientos simultáneos en comparación con los protocolos experimentales previos y posteriores de tres individuos, sugiriendo que de éstos los co-tratamientos muestran una tendencia promisoriosa hacia el potencial antigenotóxico. Sin embargo, de acuerdo con los análisis estadísticos aplicados no se detectaron tales diferencias. Es de notar que algunos de los porcentajes calculados tienen signos negativos, lo cual indica que no hubo ningún tipo de reparación del daño inducido al ADN por el agente alquilante (MMS).

Entre los factores que podrían haber influido en este trabajo, de modo que no pudieron detectarse efectos atribuibles de forma confiable a los extractos de *Cantharellus* cf. *cibarius* tales como:

- Un tamaño muestral muy reducido



Las diferencias en la respuesta celular obtenida con micronúcleos y el ensayo cometa podrían relacionarse con los diferentes end-points evaluados en cada prueba, pues los resultados divergentes entre ambas pruebas también podrían reflejar las discrepancias en ambos protocolos, ya que el tiempo usado en MN podría permitir la reparación de ADN, que no sería posible en el ensayo cometa, puesto que en éste las células son cosechadas inmediatamente después de terminar los tratamientos, sin oportunidad alguna de reparación de daños como también mencionan Gutierrez y cols. (2005). Mientras que en el caso de micronúcleos las células se fijaron 24, 30 y 48 horas después de finalizar los tratamientos. Considerando que estos periodos pudieron haber sido suficientes para que las células repararan las lesiones, no permitiendo así la manifestación de las mutaciones y que por tanto no se encontraran micronúcleos formados al momento de la cosecha de los cultivos celulares.

Tomando en cuenta el mecanismo de acción del metil metanosulfonato (MMS) y de acuerdo con Lawley y Brookes, la alquilación de la guanina es sustrato de mutaciones puntuales mientras que la despurinación de las guaninas alquiladas con la subsecuente escisión de la cadena de ADN causa mutaciones en segmento, mismas que provocan rearreglos y rupturas cromosómicas (Jürgen 1973), mecanismos responsables de la formación de micronúcleos. Sin embargo, en los ensayos realizados en este trabajo no se logró completar la fase de estandarización de esta prueba al no encontrar las condiciones propias para obtener una inducción eficiente de micronúcleos. Sometiendo a juicio la eficiencia de MMS como precursor de micronúcleos en el sistema de prueba utilizado *in vitro*.

#### Micronúcleos por bloqueo de citocinesis

- Complejidad del diseño experimental
- Demasiados tratamientos en comparación, mismos que restaron poder a la prueba estadística aplicada
- Una extracción ineficaz de los compuestos con mayor actividad antigénotoxic del hongo
- Concentraciones muy bajas de los extractos probados
- Largo tiempo de almacenamiento de los hongos recolectados

Se conocen diversos estudios de evaluación de antimutagenicidad de hongos, principalmente con *Agaricus blazei* y *Lentinula edodes* donde se emplea el ensayo de micronúcleos por bloqueo de citocinesis, sin embargo, éstos utilizan otros sistemas de prueba, así como diferentes concentraciones y formas de preparación tanto de los extractos como de la solución genotóxica. Por ejemplo, para *A. blazei* en general, en los estudios previos donde se destaca el uso de MN como biomarcador de daño, se ha empleado una concentración final de 400  $\mu\text{M}$  de MMS, pero en contraste a lo realizado en este trabajo, esta solución de mutágeno fue disuelta en DMSO (células V79) (Menoli y cols. 2001), solución de fosfatos (células V79) (Gutierrez y cols. 2004 y 2005) y PBS (células Hep-2) (Miyaji y cols. 2006). En éstos se logró una inducción eficiente de micronúcleos en los sistemas de prueba indicados, aunque es preciso mencionar que en todos estos estudios el nivel basal de frecuencia de MN en los testigos negativos siempre fue diferente a cero, es decir, 14, 8 y 16 micronúcleos y 53, 29 y 16 MN en los testigos positivos, respectivamente. Mientras que en nuestro trabajo, la frecuencia de MN fue de cero para los testigos no tratados mientras que el mayor número de MN registrados fue de 4 para el tratamiento a 4 horas de incubación con MMC a concentración de 10 ng y a un tiempo total de cultivo de 78 horas. Sin embargo, al probar esta misma concentración y tiempo de exposición a los cultivos celulares a tiempos totales de 96 horas, la ausencia de MN volvió a presentarse.

Andreoli y cols. (1999) publicaron un trabajo sobre la inducción de MN en linfocitos humanos a partir de dos donadores, en éste logran la inducción de hasta 32 MN con una concentración de 210  $\mu\text{M}$  de MMS, pero a partir de frecuencias basales de 11 MN en células en  $G_1$  y de 11 MN a partir de células en  $G_0$  y 6 MN en estado basal. Todo esto fue posible con la adición del inhibidor de reparación de ADN, la citosina B-D-arabinofturanósido (Ara-C).

En el desarrollo del trabajo pudimos observar que el tipo celular empleado tiene ciertas características en sus mecanismos de reparación no sólo cuando sufre un daño genético sino también en fases específicas de adaptación a ciertos estímulos del medio. Como consecuencia existe gran variabilidad incluso en una muestra única. Es necesario entonces, utilizar una muestra mas grande de individuos donantes para confirmar la posible actividad antigénica de los tratamientos.



El daño basal mostrado en los cultivos de linfocitos de los donantes fue evidentemente variable, aún cuando se trató de homogeneizar al grupo bajo criterios de salud. Esta consideración no excluye el hecho de que una persona presumiblemente sana tuviera daño genético. Por lo tanto, de continuar con este tipo de estudios basándose en la respuesta de linfocitos humanos, sería necesario llevar a cabo una serie de pruebas piloto con el fin de homogeneizar un grupo experimental para descartar las dificultades causadas por la variabilidad propia del sistema de prueba.

Bajo las condiciones experimentales en que se desarrolló el trabajo se puede observar una tendencia en la genoprotección de los linfocitos, cuando estuvieron expuestos al tratamiento de aplicación simultánea del genotóxico y posible antigenotóxico, en comparación con la tendencia que se mostró cuando se sometieron a los otros tratamientos (aplicación previa y posterior del antigenotóxico), lo que en un momento determinado nos haría pensar que los extractos de este hongo tienen efectos desmutagénicos.

## 10. CONSIDERACIONES FINALES

Con base en los análisis estadísticos aplicados a los datos del ensayo cometa, bajo las condiciones en que se desarrolló este trabajo es preciso mencionar que no se obtuvieron evidencias de la antigenotoxicidad potencial de los extractos acuosos de *Cantharellus* cf. *cibarius* probados, debido en gran parte a la variación evidente en cuanto a la respuesta celular de los donadores participantes. Sin embargo, el aporte de nuestro trabajo es relevante, ya que el sistema de prueba es ampliamente utilizado sin la atención propia en cuanto al diseño experimental y los análisis estadísticos más pertinentes.



## 11. PERSPECTIVAS

Recomendaciones para continuar con el estudio del potencial antigenotóxico de

*Camtharellus* cf. *cibarius*:

### Electroforesis unicelular en gel

- Sensibilizar la curva dosis-respuesta del extracto hasta encontrar la concentración más alta, pero que al mismo tiempo no dañe las células, para lo que se tomará en cuenta la viabilidad como parámetro.

- Considerar el uso de los tratamientos por duplicado por cada individuo.
- Preparar nuevos extractos a partir de hongos recolectados recientemente.

- Realizar un análisis microscópico de las preparaciones fijas por medio de software apto para la determinación de longitud y momento caudal de los cometas registrados con el fin de obtener datos de mayor precisión.

- Considerar tanto en el diseño experimental como de forma operativa, los tratamientos previos, simultáneos y posteriores como independientes entre sí, para reducir el número de tratamientos con el fin de conservar el poder de la prueba estadística a utilizar.
- Enfatizar el interés principalmente en el protocolo de tratamiento simultáneo debido a que éste presentó tendencia sobresaliente hacia la antigenotoxicidad.

### Micronúcleos por bloqueo de citocinesis

- Realizar ensayos con la adición de inhibidores de la reparación del ADN para confirmar la inducción de MN in vitro bajo las condiciones experimentales de este trabajo sobre el sistema de prueba de interés
- Llevar a cabo más pruebas donde se incluyan modificaciones en los tiempos totales de cultivo así como de adición de citocalasina B
- Considerar el uso de DMSO como solvente para la preparación de la solución genotóxica de MMS.

## 11. PERSPECTIVAS

Recomendaciones para continuar con el estudio del potencial antigenotóxico de

*Camiharellus* cf. *cibarius*:

### Electroforesis unicelular en gel

- Sensibilizar la curva dosis-respuesta del extracto hasta encontrar la concentración más alta, pero que al mismo tiempo no dañe las células, para lo que se tomará en cuenta la viabilidad como parámetro.
- Considerar el uso de los tratamientos por duplicado por cada individuo.
- Preparar nuevos extractos a partir de hongos recolectados recientemente.
- Realizar un análisis microscópico de las preparaciones fijas por medio de software apto para la determinación de longitud y momento caudal de los cometas registrados con el fin de obtener datos de mayor precisión.
- Considerar tanto en el diseño experimental como de forma operativa, los tratamientos previos, simultáneos y posteriores como independientes entre sí, para reducir el número de tratamientos con el fin de conservar el poder de la prueba estadística a utilizar.
- Enfatizar el interés principalmente en el protocolo de tratamiento simultáneo debido a que éste presentó tendencia sobresaliente hacia la antigenotoxicidad.

### Micronúcleos por bloqueo de citocinesis

- Realizar ensayos con la adición de inhibidores de la reparación del ADN para confirmar la inducción de MN in vitro bajo las condiciones experimentales de este trabajo sobre el sistema de prueba de interés
- Llevar a cabo más pruebas donde se incluyan modificaciones en los tiempos totales de cultivo así como de adición de citocalasina B
- Considerar el uso de DMSO como solvente para la preparación de la solución genotóxica de MMS.



## 1. REFERENCIAS

- Ajchart A, Chlopkiewicz B, Czarnomska A y Koziorowska J. 1990. Riboflavin effects on benzo(a)pyrene, 2-acetaminylfluorene and methyl methanesulfonate mutagenicity *in vitro*. *Pol J Pharmacol Pharm* 42 (2): 159-164.
- Ayub MY y Sachan DS. 1997. Dietary factors affecting aflatoxin B<sub>1</sub> carcinogenicity. *Mal J Nutr* 3:161-179, 1997.
- Bellini MF, Giacomini NL, Eira AF, Ribeiro LR y Mantovani MS. 2003. Anticlastogenic effect of aqueous extracts of *Agaricus blazei* on CHO-k1 cells, studying different developmental phases of the mushroom. *Toxicol. In Vitro*. 17: 465-469.
- Bellini MF, Angeli JPF, Matuo R, Terezan AP, Ribeiro LR y Mantovani MS. 2006. Antigenotoxicity of *Agaricus blazei* mushroom organic and aqueous extracts in chromosomal aberration and cytokinesis block micronucleus assays in CHO-k1 and HTC cells. *Toxicol. In Vitro*. 20: 355-360.
- Beranek DT. 1990. Distribution of methyl and ethyl adducts following alkylation with monofunctional alkylating agents. *Mutat Res* 231: 11-30.
- Bernas E, Jaworska G y Lisiewska Z. 2006. Edible mushrooms as a source of valuable nutritive constituents. *Acta Sci. Pol., Technol. Aliment.* 5 (1): 5-20.
- Bijur GN, Ariza ME, Hitchcock CL, Williams MV. 1997. Antimutagenic and promutagenic activity of ascorbic acid during oxidative stress. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 30 (3): 339-345.
- Brockman HE, Snack HF y Waters MD. 1992. Antimutagenicity profiles of some natural substances. *Mutat. Res.* 267: 157-172.
- Çaglarırmak N, Unal K, Otles S. 2002. Nutritional value of edible wild mushrooms collected from the Black Sea region of Turkey. *Micologia Aplicada Internacional*. 14 (1): 1-5.
- De Flora S. 1988. Problems and prospects in antimutagenesis and anticarcinogenesis. *Mutat. Res.* 202: 279-283.
- De Lima PLA, Denadaı DR, Mariko SM, Ferreira Da EA, Fávoro SDM y Speit G. 2001. *Lentinula edodes* (Berk.) Pegler (Shiitake) modulates genotoxic and mutagenic effects induced by alkylating agents *in vivo*. *Mutat. Res.* 496: 23-32.
- Delmanto DR, De Lima PLA, Mariko SM, Ferreira da EA, Fávoro SDM, Speit G y Ribeiro LR. 2001. Antimutagenic effect of *Agaricus blazei* Murrill mushroom on the genotoxicity induced by cyclophosphamide. *Mutat. Res.* 496:15-21.
- Dıaz-Godınez G, Sánchez C y Romero-Gómez S. 2002. Production and medicinal properties of mushrooms. *Nutraceuticals July/August*: 37-40.

- Fairbairn DW, Olive PL y O'Neill KL. 1995. The comet assay: a comprehensive review. *Mutat. Res.* 339: 37-59.
- Ferguson LR. 1994. Antimutagens as cancer chemopreventive agents in the diet. *Mutat. Res.* 307: 395-410.
- Fenech M, Drosti IE y Rinaldi JR. 1997. Folate, vitamin B12, homocystein status and chromosome damage rate in lymphocytes of older men. *Carcinogenesis* 18 (7): 1329-1336.
- Fenech M. 2000. The in vitro micronucleus technique. *Mutat. Res.* 455: 81-95.
- Ghaskadbi S, Rajmachi S, Agate C, Kapadi AH y Vaidya VG. 1981. Modulation of cyclophosphamide mutagenicity by vitamin C in the in vivo rodent micronucleus assay. *Teratogenesis, Carcinogenesis, and Mutagenesis* 12 (1): 11-17.
- Grüter A, Friedrich U y Würzler FE. 1990. Antimutagenic effects of mushrooms. *Mutat. Res.* 231: 243-249.
- Guevara GG, Garza OF, Cázares GE. 2004. Estudio del ITS nuclear en algunas especies del género *Cantharellus* de México. *Ciencia UANL* 7 (003): 371-378.
- Gutierrez ZR, Mantovani MS, Eira AF, Ribeiro LR y Jordao BQ. 2004. Variation of the antimutagenicity effects of water extracts of *Agaricus blazei* Murrill *in vitro*. *Toxicol. In Vitro.* 18: 301-309.
- Gutierrez ZR, Mantovani MS, Ferreira Da EA, Regina RL y Quinzani JB. 2005. Genotoxic and antigenotoxic effects of organic extracts of mushroom *Agaricus blazei* Murrill on V79 cells. *Genetics and Molecular Biology* 28 (3): 458-463.
- Hainaut P y Pfeifer GP. Patterns of p53 G-T transversions in lung cancers reflect the primary mutagenic signature of DNA-damage by tobacco smoke. *Carcinogenesis* 22: 367-374.
- Hartman PE y Shankel DM. 1990. Antimutagens and anticarcinogens: a survey of putative interceptor molecules. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 15: 145-182.
- Hayashi S, Watanabe J y Kawajiri K. 1992. High susceptibility to lung cancer analyzed in terms of combined genotypes of P450A1 and Mu-class glutathione S-transferase genes. *Jpn J Cancer Res* 83: 866-870.
- Hill A y Wolff S. 1983. Sister chromatid exchanges and cell division delays induced by diethylstilbestrol, estradiol, and estril in human lymphocytes. *Cancer research.* 43: 4114-4118.



- Hussain SP, Amstad P, Raja K, Sawyer M, Hofset L, Shields PG y cols. 2001. Mutability of p53 hotspot codons to benzo(a)pyrene diol epoxide (BPDE) and the frequency of p53 mutations in nontumorous human lung. *Cancer Res* 61: 6350-6355.
- Itoh H, Amano H, Noda H. 1994. Inhibitory action of a (1-6) B-D-glucan-protein complex (FIII-2-b) isolated from *Agaricus blazei* Murill ("Himmematsutake") on metha fibrosarcoma bearing mice and its antitumor mechanism. *Jpn. J. Pharmacol.* 66: 265-271.
- Jackson H. 1964. The effects of alkylating agents on fertility. *Br. Med. Bull* 20: 107-114.
- Jiménez L. F. y H. Merchant. El genoma humano. Los cromosomas humanos. En: Gaona L. (Ed.) 2003. *Biología celular y molecular*. Prentice Hall, México. 853 pp.
- Kawagishi H, Inagaki R, Kanao T, Mizuno T, Shimura K, Ito H, Hagiwara T, Nakamura T. 1989. Fractionation and antitumor activity of the water-insoluble residue of *Agaricus blazei* fruiting bodies. *Carbohydr. Res.* 186: 267-274.
- Kawagishi H, Kanao T, Inagaki R, Mizuno T, Shimura K, Ito H, Hagiwara T, Nakamura T. 1990. Formolysis of a potent antitumor (1-6) B-D-glucan-protein complex from *Agaricus blazei* fruiting bodies and antitumor activity of the resulting products. *Carbohydr. Polymers* 12: 393-403.
- Kaya B. 2003. Antigenotoxic effect of ascorbic acid on mutagenic dose of three alkylating agents. *Turk J Biol* 27: 241-246.
- Kent C. 1998. *Basics of Toxicology*. Wiley. New York. 269 pp.
- Kirsch-Volders M y Fenech M. 2001. Inclusion of micronuclei in non-divided mononuclear lymphocytes and necrosis-apoptosis may provide a more comprehensive cytokinesis block micronucleus assay for biomonitoring purposes. *Mutagenesis* 16: 51-58.
- Kuroda Y, Jain AK, Tezuka H y Kada T. 1992. Antimutagenicity in cultured mammalian cells. *Mutat. Res.* 267:201-209.
- Kyrtopoulos SA. 1998. DNA adducts in humans alter exposure to methylating agents. *Mutat. Res.* 405: 135-143.
- Leon-Guzmán MF, Silva I y López MG. 1997. Proximate chemical composition, free aminoacid contents and free fatty acid contents of some wild edible mushrooms from Querétaro, México. *J. Agric. Food. Chem.* 45: 4329-4332.
- Lewin B. 2001. *Diversidad inmunitaria*. En: Genes VII. Lewin B. Editorial Marbán. Madrid, España. pp 741-772.
- Lohman PHM, Gentile JM, Gentile G, Ferguson y LR. 2001. Antimutagenesis/anticarcinogenesis 2001: screening, methods and biomarkers. *Mutat Res.* 496: 1-4.

- Lukienko PI, Mel'nichenko NG, Zverinskii IV y Zabrudskaya SV. 2000. Bulletin of experimental Biology and Medicine 130 (9).
- Luiz RC, Jordao BQ, Ribeiro LR y Mantovani MS. 2003. Mechanism of antilastogenicity of *Agaricus blazei* Murrill mushroom organic extracts in wild type CHO (K1) and repair deficient (xrs5) cells by chromosome aberration and sister chromatid exchange assays. Mutat. Res. 528: 75-79.
- Matter B, Wang G, Jones R y Tretyakova N. 2004. Formation of diastereomeric benzo(a)pyrene diol epoxide-guanine adducts in p53 gene-derived DNA sequences. Chem Res Toxicol 17: 731-741.
- Mattila P, Könkö K, Eurola M, Pihlava JM, Astola J, Vaheristo L, Hietaniemi V, Kumpulainen J, Valtonen M y Piironen V. 2001. Contents of vitamins, mineral elements and some phenolic compounds in cultivated mushrooms. J. Agric. Food Chem. 49: 2343-2348.
- Menoli RC, Mantovani MS, Ribeiro LR, Speit G y Quinzani BJ. 2001. Antimutagenic effects of the mushroom *Agaricus blazei* Murrill extracts on V79 cells. Mutat. Res. 496: 5-13.
- Miyaji CK, Jordao BQ, Ribeiro LR, Eira AF y Cólus IMS. 2004. Genotoxicity and antigenotoxicity assessment of shiitake (*Lentinula edodes* (Berkeley) Pegler) using the Comet assay. Genetics and Molecular Biology 27 (1): 108-114.
- Miyaji CK, Poersch A, Ribeiro LR, Eira AF y Cólus IMS. 2006. Shiitake (*Lentinula edodes* (Berkeley) Pegler) extracts as a modulator of micronuclei induced in Hep-2 cells. Toxicol. In Vitro 20: 1555-1559.
- Mizuno T, Inagaki R, Kanao T, Hagiwara T, Nakamura T, Ito H, Shimura K, Sumiya T, Asakura A. 1990. Antitumor activity and some properties of water-insoluble hetero-glycans from "Himmatsutake", the fruiting body of *Agaricus blazei* Murrill. Agric. Biol. Chem. 54: 2897-2906.
- Moller P. 2006. The Alkaline Comet Assay: Towards Validation in Biomonitoring of DNA Damaging Exposures. Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology 98: 336-345.
- Montoya A, Kong A, Estrada-Torres A, Cifuentes J y Caballero J. 2004. Useful wild fungi of La Malinche National Park, Mexico. Fungal Diversity.
- Moreno A y Carrillo Gallego E. 2002. Técnicas de estudio de la mutagenicidad. Hig. Sanid. Ambient. 2: 26-32.
- Moreno GMD. 2003. Toxicología ambiental. Evaluación de riesgo para la salud humana. McGraw-Hill. Madrid, España.



- Lukienko PI, Mel'nichenko NG, Zverinskii IV y Zabrodskaya SV. 2000. Bulletin of experimental Biology and Medicine 130 (9).
- Luiz RC, Jordao BQ, Da Eira AF, Ribeiro LR y Mantovani MS. 2003. Mechanism of anticlastogenicity of *Agaricus blazei* Murrill mushroom organic extracts in wild type CHO (K1) and repair deficient (xrs5) cells by chromosome aberration and sister chromatid exchange assays. Mutat. Res. 528: 75-79.
- Matter B, Wang G, Jones R y Tretyakova N. 2004. Formation of diastereomeric benzo(a)pyrene diol epoxide-guanine adducts in p53 gene-derived DNA sequences. Chem Res Toxicol 17: 731-741.
- Mattila P, Könkö K, Eurola M, Pihlaja JM, Astola J, Vahteristo L, Hietaniemi V, Kumpulainen J, Valtanen M y Piironen V. 2001. Contents of vitamins, mineral elements and some phenolic compounds in cultivated mushrooms. J. Agric. Food Chem. 49: 2343-2348.
- Menoli RC, Mantovani MS, Ribeiro LR, Speit G y Quinzani BJ. 2001. Antimutagenic effects of the mushroom *Agaricus blazei* Murrill extracts on V79 cells. Mutat. Res. 496: 5-13.
- Miyaji CK, Jordao BQ, Ribeiro LR, Eira AF y Cólus IMS. 2004. Genotoxicity and antigenotoxicity assessment of shiitake (*Lentinula edodes* (Berkeley) Pegler) using the Comet assay. Genetics and Molecular Biology 27 (1): 108-114.
- Miyaji CK, Poersch A, Ribeiro LR, Eira AF y Cólus IMS. 2006. Shiitake (*Lentinula edodes* (Berkeley) Pegler) extracts as a modulator of micronuclei induced in Hep-2 cells. Toxicol. In Vitro 20: 1555-1559.
- Mizuno T, Inagaki R, Kanao T, Hagiwara T, Nakamura T, Ito H, Shimura K, Sumiya T, Asakura A. 1990. Antitumor activity and some properties of water-insoluble heteroglycans from "Himematsutake", the fruiting body of *Agaricus blazei* Murrill. Agric. Biol. Chem. 54: 2897-2906.
- Moller P. 2006. The Alkaline Comet Assay: Towards Validation in Biomonitoring of DNA Damaging Exposures. Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology 98: 336-345.
- Montoya A, Kong A, Estrada-Torres A, Cifuentes J y Caballero J. 2004. Useful wild fungi of La Malinche National Park, Mexico. Fungal Diversity.
- Moreno A y Carrillo Gallego E. 2002. Técnicas de estudio de la mutagenicidad. Hig. Sanid. Ambient. 2: 26-32.
- Moreno GMD. 2003. Toxicología ambiental. Evaluación de riesgo para la salud humana. McGraw-Hill. Madrid, España.

- Fungi from Natural Resources for Novel Products. Editorial Kluwer Academic/Plenum publishers. Nueva York. 41-49 pp.
- Shi Y, James A, Benzie I y Buswell J. 2002. Mushroom-Derived Preparations in the Prevention of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Induced Oxidative Damage to Cellular DNA. Teratogenesis, Carcinogenesis and Mutagenesis 22: 103-111.
- Shon Y y Nam K. 2001. Antimutagenicity and induction of anticarcinogenic phase II enzymes by basidiomycetes. Journal of Ethnopharmacology 77: 103-109.
- Singh J. 1999. Ethnomycology and folk remedies: fact and fiction. En: Singh J and K. R. Anja (Eds.) 1999. From Ethnomycology to Fungal Biotechnology. Exploiting Fungi from Natural Resources for Novel Products. Editorial Kluwer Academic/Plenum publishers. Nueva York. 11-17 pp.
- Suzuki T. 2006. DNA damage and mutation caused by vital biomolecules, water, nitric oxide, and hypochlorous acid. Genes and environment. 28 (2): 48-55.
- Taira K, Miyashita Y, Okamoto K, Arimoto S, Takahashi E y Negishi T. 2005. Novel antimutagenic factors derived from the edible mushroom *Agrocybe cylindracea*. Mutat. Res. 586: 115-123.
- Wasser SP. 1999. Therapeutic effects of substances occurring in higher Basidiomycetes mushrooms: a modern perspective. Crit. Rev. Immunol. 19: 65-96.
- Wattenberg L W. 1985. Chemoprevention of cancer. Cancer research 45: 1-8.
- Zalacain M, Sierrasesúmbaga L y Patiño A. 2005. The CBMN assay as a measure of genetic instability induced by genotoxic agents. An. Sist. Sanit. Navar. 28 (2): 227-236.