

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES OCEANOLÓGICAS



**EFFECTOS ANTIGENOTÓXICOS DE LOS POLISACÁRIDOS
SULFATADOS DEL ALGA VERDE *Ulva clathrata* EN LEUCOCITOS
HUMANOS EXPUESTOS A ARSENITO DE SODIO**

TESIS

**PARA CUBRIR PARCIALMENTE LOS REQUISITOS NECESARIOS PARA
OBTENER EL GRADO DE**

**MAESTRÍA EN CIENCIAS EN ECOLOGÍA MOLECULAR Y
BIOTECNOLOGÍA**

PRESENTA

DILAYAXI CÁRDENAS BAUTISTA

ENSENADA, BAJA CALIFORNIA, MÉXICO. 17 DE DICIEMBRE DEL 2009

FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES OCEANOLÓGICAS
POSGRADO EN ECOLOGÍA MOLECULAR Y BIOTECNOLOGÍA

EFFECTOS ANTIGENOTÓXICOS DE LOS POLISACÁRIDOS
SULFATADOS DEL ALGA VERDE *Ulva clathrata* EN LEUCOCITOS
HUMANOS EXPUESTOS A ARSENITO DE SODIO

TESIS

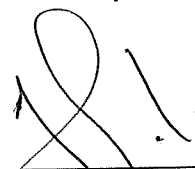
PARA CUBRIR PARCIALMENTE LOS REQUISITOS NECESARIOS PARA
OBTENER EL GRADO DE

MAESTRÍA EN CIENCIAS

PRESENTA

DILAYAXI CÁRDENAS BAUTISTA

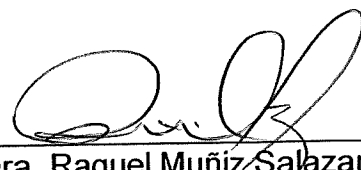
Aprobada por:



Dr. Isaí Pacheco Ruíz
Presidente del jurado



M.C. Evarista Arellano García
Sinodal



Dra. Raquel Muñoz Salazar
Sinodal



M.C. Raúl C. Baptista Rosas
Sinodal

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por otorgarme beca para estudios de maestría durante el periodo de febrero del 2008 a julio del 2008.

Al Instituto de Investigaciones Oceanológicas por los fondos otorgados al proyecto de investigación.

A la Facultad de Ciencias Marinas de la Universidad Autónoma de Baja California por el apoyo administrativo y docente que recibí durante mi estancia en el desarrollo de mis estudios de maestría.

A todo el personal docente de la maestría de Ecología Molecular y Biotecnología por el invaluable acervo de conocimientos compartidos en el estudio de la maestría.

A la mi director de **Tesis Dr. Isaí Pacheco Ruíz**, por compartir su interés y admiración por la ciencia aplicada y por su apoyo constante durante la elaboración de esta tesis.

A mis sinodales **Dra. Raquel Muñoz Salazar, M.C. Raúl Baptista Rosas** por los consejos y por el conocimiento que aportaron para la realización de este trabajo y **en especial a la M.C. Evarista Arellano Rosas** por todo su apoyo incondicional, moral, económico, logístico y de conocimiento para la realización del diseño experimental, y por sus apreciados y acertados consejos.

A mi padre **Juan Manuel Cárdenas** por apoyarme siempre, por enseñarme a tener metas y llegar a ellas sin importar el esfuerzo que este implique.

A **Oc. Alberto Gálvez** por su apoyo en el laboratorio durante el cultivo del alga, el uso del microscopio y el uso de los programas computacionales.

A **M.C. Enrique Hernández Garibay** por su paciencia y enseñanza durante la extracción del polisacárido sulfatado.

A **M.C. Balam García Ruíz** por su apoyo y disposición en todo momento.

A **Erika, Nancy, Verónica, Victoria y Rafael** que siempre tuvieron tiempo para ayudarme pese a sus múltiples ocupaciones.

A **M.C. Juan Manuel Vivas** por su apoyo inicial mientras estuvo en el laboratorio del IIO.

A mis compañeros de trabajo: **David, Raquel, Aurora y Patricia** por su comprensión y constante apoyo.

A **M.C. Francisco Casillas** por sus charlas amenas y café.

A los voluntarios que donaron su sangre para la realización de los experimentos de esta tesis de forma desinteresada.

A todos ellos que de alguna forma participaron en este trabajo, y que no mencione, se que siempre se quedan nombres pendientes.

A mi esposo **Oc. Roberto Calderón Campos** por su paciencia, apoyo y buenos consejos durante todo el estudio de la maestría y la escritura de esta tesis.

DEDICATORIA

A mi hijo **Miguel Ángel Calderón Cárdenas** que es mi constante inspiración.

Resumen.

El arsénico es un potente carcinógeno que se encuentra en el aire, tierra y principalmente en el agua que se obtiene de los pozos profundos. La exposición al arsénico causa daño en la estructura del ADN que puede resultar en el desarrollo de células cancerígenas. Algunos metabolitos naturales pueden prevenir el desarrollo de cáncer. Los extractos de algas marinas como polisacáridos sulfatados tienen metabolitos con actividad hipolipomiente, antiviral, antiinflamatoria y antitumoral. El presente estudio utilizó el arsenito de sodio (NaAsO_2) como inductor genotóxico y midió el daño genotóxico con la técnica de micronúcleos (Mn). El objetivo fue valorar la actividad antigenotóxica del polisacárido sulfatado (PSS) del alga verde *Ulva clathrata* contra el arsenito de sodio. La hipótesis a probar es que los polisacáridos sulfatados del *U. clathrata* disminuye el daño genotóxico inducido por el NaAsO_2 en leucocitos humanos. Para probar lo anterior el PSS se obtuvo triturando el alga seca con mortero, se disolvió en 4 volúmenes de agua, se calentó a 60 °C, se filtró, se precipitó en alcohol y se secó en una estufa a 60 °C temperatura constante. Los leucocitos se obtuvieron de sangre periférica de pacientes masculinos sanos de entre 20 y 35 años. Se utilizó la técnica de Mn para determinar el daño genotóxico descrita por Fenech (2000). El NaAsO_2 y el PSS se agregaron en el momento del bloqueo de la citocinesis. Las concentraciones de NaAsO_2 fueron 100, 500 y 1000 μM y las concentraciones del PSS fueron de 0.1, 0.5 y 1 mgL^{-1} . El experimento tuvo tres replicas y se obtuvieron 32 laminillas por sujeto, de las cuales se tomó su índice nuclear, y el número de Mn por cada mil células binucleadas. El análisis de varianza mostró que el NaAsO_2 disminuye significativamente el índice de proliferación celular ($p=0.000039$). El PSS no disminuyó de manera significativa el índice de proliferación celular ($p=0.706$). El índice de proliferación celular más bajo, se presentó en la concentración 1000 μM del NaAsO_2 vs 1 mgL^{-1} del PSS con un índice de proliferación celular de 1.25. El testigo presentó un índice de proliferación de 1.5. El efecto individual del NaAsO_2 mostró un incremento de Mn (39 ± 2.69 en 1000 μM), el PSS también mostró un incremento en el número de Mn (39 ± 2.8 en 0.1 mgL^{-1}). Para el efecto combinado se observó un notable incremento Mn en 1000 μM de NaAsO_2 vs 0.1 mgL^{-1} del PSS (69.3 ± 3.4), la cantidad más baja de Mn se observó en la combinación de 500 μM de NaAsO_2 vs 1 mgL^{-1} del PSS (30 ± 3.4). El testigo mostró 3.66 ± 3.45 Mn. El análisis de varianza multivariado arrojó que tanto el PSS como el NaAsO_2 incrementan de manera significativa el número de Mn ($p=0.000002$). Por lo anterior se concluye que el PSS del alga verde *Ulva clathrata* redujo el número de Mn en las diferentes combinaciones, funcionando como amortiguador cuando la concentración del NaAsO_2 fue de 1000 μmolar vs 0.1 mgL^{-1} del PSS (69.36 ± 3.45), en relación a la concentración del 1000 μmolar del NaAsO_2 vs 0.5 y 1 mgL^{-1} del PSS (34.17 y 33.17 ± 3.45); sin embargo este efecto no es antigenotóxico porque el número de Mn no se redujo por debajo de los testigos (3.66 ± 3.45). El PSS es un genotóxico porque indujo la formación de micronúcleos.

Palabras clave: Antigenotóxico, Polisacáridos sulfatados, Arsenito de sodio, *Ulva clathrata*

ÍNDICE GENERAL

	Página
Portada	I
Carta de Aprobación	II
Agradecimientos	III
Dedicatoria	IV
Resumen	V
Índice general	1
Índice de Tablas	2
Índice de Figuras	3
1. Introducción	7
1.1. Antecedentes	10
1.2. Objetivos	22
1.3. Hipótesis	23
2. Metodología	24
2.1. Cultivo algal, extracción del polisacárido sulfatado y preparación del arsenito de sodio.	24
2.2. Selección de los participantes	25
2.3. Obtención, siembra y fijación de leucocitos	26
2.4 Tinción y lectura de Laminillas	31
3. Resultados	35
4. Discusión	46
5. Conclusión	49
6. Literatura citada	50

7. Glosario	56
8. Anexos	58
8.1. Solicitud de la Revisión del Protocolo de Investigación	58
8.2. Aceptación del Protocolo de Investigación por el Comité de Ética del Hospital Militar Regional, El Ciprés, B.C.	59
8.3. Consentimiento Informado	60
8.4. Formato de Examen Médico	64

ÍNDICE DE TABLAS

	Página	
Tabla I	Factores de Riesgo para Cáncer	11
Tabla II	Tratamientos a los que se sometieron los leucocitos	32
Tabla III	Estadística básica del índice de proliferación celular en los 16 tratamientos	35
Tabla IV	Análisis de varianza del NaAsO ₂ y el PSS sobre el índice de proliferación celular	36
Tabla V	Comparación múltiple por Tukey's por el NaAsO ₂ sobre el índice de proliferación celular	38
Tabla VI	Estadística básica del número de Mn en los 16 tratamientos	39
Tabla VII	Análisis de varianza de las diferentes concentraciones del NaAsO ₂ y el PSS sobre el numero de Mn	40
Tabla VIII	Comparación múltiple por Tukey's por el factor del NaAsO ₂ .sobre el numero de Mn.	42
Tabla IX	Comparación múltiple por Tukey's por el factor del NaAsO ₂ a una concentración de 100µM sobre el número de Mn.	43
Tabla X	Comparación múltiple por Tukey's por el factor del PSS a sobre el número de Mn.	44

Tabla XI Comparación múltiple por Tukey por el factor del PSS a 45
una concentración de 1mgL^{-1} .

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Mecanismos carcinogénicos del arsénico	14
Figura 2	Obtención del alga verde <i>U. clathrata</i> , selección y cultivo	24
Figura 3	Extracción de sangre por venopunción en el brazo	26
Figura 4	Siembra e incubación de los leucocitos	27
Figura 5	Bloqueo de la proliferación celular	28
Figura 6	Resuspensión del cultivo celular	29
Figura 7	Lavado del botón celular.	30
Figura 8	Tinción y lectura de las laminillas	31
Figura 9	Fotografías de leucocitos normales	34
Figura 10	Fotografías de leucocitos con micronúcleos.	34
Figura 11	Efecto del PSS sobre el índice nuclear	37
Figura 12	Efecto del NaAsO_2 sobre el índice nuclear	37
Figura 13	Efecto combinado del PSS sobre el número de Mn	40
Figura 14	Efecto combinado del NaAsO_2 sobre el número de Mn	41

Figura 15 Efecto combinado del PSS y NaAsO_2 sobre el número de Mn 39

1. INTRODUCCIÓN

El cáncer es la primera causa de muerte en el mundo, y en México es la tercera causa de muerte arrebatándole la vida a más de 61 mil personas por año (INEGI, 2008). De acuerdo al consenso de la evidencia científica, los principales factores de riesgo para desarrollar cáncer son la herencia, el contacto con sustancias químicas, infecciones, rayos X y alteraciones del sistema inmunológico (Wattenberg, 1985). El 90% de los cánceres son originados por sustancias químicas (Anand et al., 2008). Dentro de las principales sustancias químicas donde se ha documentado ampliamente su efecto carcinogénico por daño al genoma celular o genotoxicidad, se encuentran los metaloides como el arsénico, mercurio y cromo (Pradosh et al., 2002).

El arsénico es considerado el carcinógeno más potente al que se expone el ser humano y se encuentra en el ambiente: en la tierra, en el aire, en los alimentos y principalmente, en el agua que se obtiene de pozos profundos (Pradosh et al., 2002).

Respecto a él agua, la norma de la Organización Mundial de la Salud (OMS) establece que la cantidad máxima permisible de arsénico para consumo humano es de 50 mgL^{-1} (Mukherjee et al., 2007). En México, la norma oficial mexicana NOM-127SSA-1-1994 no permite niveles máximos de 25 mgL^{-1} . Sin embargo, en estados como Baja California Sur, Chihuahua, Coahuila, Durango,

Guanajuato, Hidalgo y Morelos, donde el agua se obtiene principalmente de pozos profundos, presentan concentraciones superiores a la norma. En un estudio recientemente realizado en los estados de Durango y Coahuila, en el norte de la República Mexicana, se encontró que el agua de su red de abastecimiento tiene un nivel de 4.1 mg/L, esto significa que los niveles están 164% por encima de la norma oficial vigente (Fuentes-Díaz, 2005). Por ello, las personas que consumen agua con altos niveles de arsénico desarrollan enfermedades como hiperqueratosis y cáncer de piel, vejiga, hígado y pulmones (Salnikow y Zhitkovich, 2009). La exposición al arsénico en estas poblaciones humanas inducen alteraciones cromosómicas y daño directo sobre la cadena del Ácido Desoxirribonucleico (ADN) induciendo la proliferación de células cancerígenas (Pradosh *et al.*, 2002).

Investigaciones recientes demuestran que existen sustancias con características quimiopreventivas, antioxidantes o antígenotóxicas, es decir, que previenen o inhiben el desarrollo de cáncer provocado por sustancias químicas. Entre estos se encuentran algunas plantas terrestres como: el té verde, que se extrae de la planta *Camelia sinensis* (Glei *et al.*, 2006); también la curcumina, un compuesto natural que se utiliza en India y se obtiene de la planta *Curcuma longa* (Sutapa *et al.*, 2007); el ácido ascórbico, conocido como vitamina C, que se encuentra en la mayoría de los cítricos; el tocoferol o vitamina E, que se encuentra en el germen de trigo y la yema de huevo y los carotenoides, que se encuentran en frutas y verduras como el jitomate, uva, sandía y durazno (Anand

et al., 2008). Se sabe también que algunas algas marinas también muestran tener efectos antigenotóxicos, antitumorales y/o antioxidantes, un ejemplo de esto son las algas rojas *Symphyocladia latiuscula*, *Rhodomela confervoides*, *Polysiphonia urcedata*, *Gloiopeltis furcata* y *Kappaphycus striatum* (Huarnao, 2004), las algas pardas *Leathesia difformes*, *Punctaria latifolia* y *Scytosiphon lomentaria* y el alga verde *Ulva pertusa* (Xu *et al.*, 2004, Qi *et al.*, 2005). En algunas algas pardas, sus polisacáridos sulfatados demuestran tener efectos antigenotóxicos, como se ha demostrado en *Fucus vesiculosus* (Leite-Silva *et al.*, 2007).

Adicionalmente, pruebas de laboratorio demuestran que las algas verdes de la familia *Ulvaceae*, presentan polisacáridos muy similares a los que se encuentran en algas pardas. Meza-Soria (2008), demuestra que *Ulva clathrata* posee 11% de polisacáridos sulfatados en su materia orgánica (Hernández-Garibay *et al.*, 2006). Es por ello que con esta investigación, se evaluaron las características antigenotóxicas de los polisacáridos de *U. clathrata* similares a los que han sido descritos en otras especies del genero *Ulvaceae* (Qi *et al.*, 2005; Xu *et al.*, 2004).

1.1 ANTECEDENTES

Cáncer es el crecimiento tisular patológico originado por una proliferación continua de células anormales. Produce una enfermedad por su capacidad para elaborar sustancias con actividad biológica nociva, potencial invasión y destrucción de los tejidos adyacentes o a distancia. El cáncer, que puede originarse a partir de cualquier tipo de célula de los diferentes tejidos del organismo, no es una enfermedad única, sino un conjunto de enfermedades con manifestaciones y curso clínico muy variable, en función de la localización y de la célula de origen. El cáncer es, en esencia, un proceso genético que se presenta como resultado de una serie de mutaciones secuenciales en el genoma y cambios epigenéticos que conduce a la malignización de las células que se multiplican de forma irregular y con alteraciones en su morfología. (Encarta. 2008, Instituto Nacional de Cáncer, EUA. 2005, Kim y Hahn, 2007).

Ciertos factores como la herencia (predisposición genética), infecciones (VIH, *Helicobacter pylori*), radiaciones (rayos X, rayos UV), productos químicos (arsénico) y alteraciones en el sistema inmunológico, son capaces de provocar cáncer en los individuos expuestos a ellos (Tabla I). Estos factores inducen o facilitan la carcinogénesis y se conocen como sustancias genotóxicas o mutagénicas (Donaldson, 2004).

Tabla. I.- Factores de Riesgo para Cáncer

Herencia	Químicos	Físicos	Infecciones	Sistema Inmunológico
Tiroideo	Hidrocarburos aromáticos	Campos electromagnéticos	Virus Papiloma Humano	Deficiencias Congénitas
Testicular	Alcohol	Rayos UV	Virus Epstein Barr	Fármacos
Laríngeo	Cloro	Rayos X	Sarcoma Kaposi	SIDA
Mieloma	Nitratos	Teléfonos móviles	Herpes virus	
Pulmón	Pesticidas		VIH	
Colorectal	Tabaco		Virus Hepatitis B	
Riñón	Oxido nítrico		Virus Hepatitis C	
Próstata	Contaminación		<i>Helicobacter pylori</i>	
Melanoma	Metales		Helmintiasis	
Mama	Metaloideos		Esquistosomiasis	
	Medicinas			
	Cosméticos			
	Aditivos			
	Dieta			
	Dioxinas			
	Nitrosaminas			

Diversos estudios clínicos y de laboratorio han demostrado que los cambios genéticos están directamente relacionados con el desarrollo de la carcinogénesis tanto en las etapas tempranas como en las tardías. Estos eventos incluyen la acumulación de alteraciones en los genes, anormalidad en la proliferación, alteraciones en la diferenciación celular, y falla en los mecanismos de autoreparación quedándose las células inmaduras e inmortales. Como parte de este proceso se estimulan las reacciones inflamatorias y se elevan los índices de proliferación celular (Rosin, 1993).

El 90% de los cánceres humanos se producen por compuesto químicos que promueven mutaciones en las células (Anand *et al.*, 2008). Estos se encuentran en los alimentos como la carne, que produce aminas heterocíclicas durante la cocción, los aditivos como los preservadores, los contenedores plásticos que

contienen bisfenol el cual migra a la comida, así como el uso del tabaco y excesos continuos del consumo de alcohol (Wattenberg, 1985).

La sensibilidad entre los individuos es muy diferente debido al largo y complicado proceso que se desarrolla entre el ser humano y el agente carcinogénico, el tiempo de aparición de los cambios cromosómicos y la detección de los mismos (Anwar, 1991). Vogel (1978) define este proceso en tres fases:

1. La entrada del genotóxico al cuerpo humano y su excreción que va directamente relacionada con la dosis del agente y su concentración en diferentes órganos.
2. Metabolismo del agente genotóxico que es directamente proporcional con la función de destoxificación y activación del hígado y otros órganos importantes que pueden ser influenciados por el ambiente, así como los factores genéticos.
3. El contacto directo del agente con las cadenas de ADN, el cual depende de cada individuo y de su capacidad de reparar el ADN dañado.

En el medio ambiente se encuentran sustancias cancerígenas que son difíciles de remover debido a su ubicuidad, como es el caso de las radiaciones, metales y/o metaloides. Estos existen naturalmente y otros son producidos o se incrementan por el impacto de las actividades del hombre sobre el ambiente (Pradosh y Anupama, 2002; Wattenberg, 1985). Un ejemplo de esto, son los

metaloides genotóxicos como el cadmio, el mercurio y el arsénico entre otros. En el caso del arsénico la exposición o ingesta continua causa enfermedades como la del pie negro (que afecta a la circulación vascular periférica), neuropatías periféricas, hiperqueratosis, despigmentación, padecimientos gastrointestinales y puede provocar varios tipos de cáncer como piel, pulmón, hígado y vejiga (Warner, 2004, Gosh *et al.*, 2008, Figura 1).

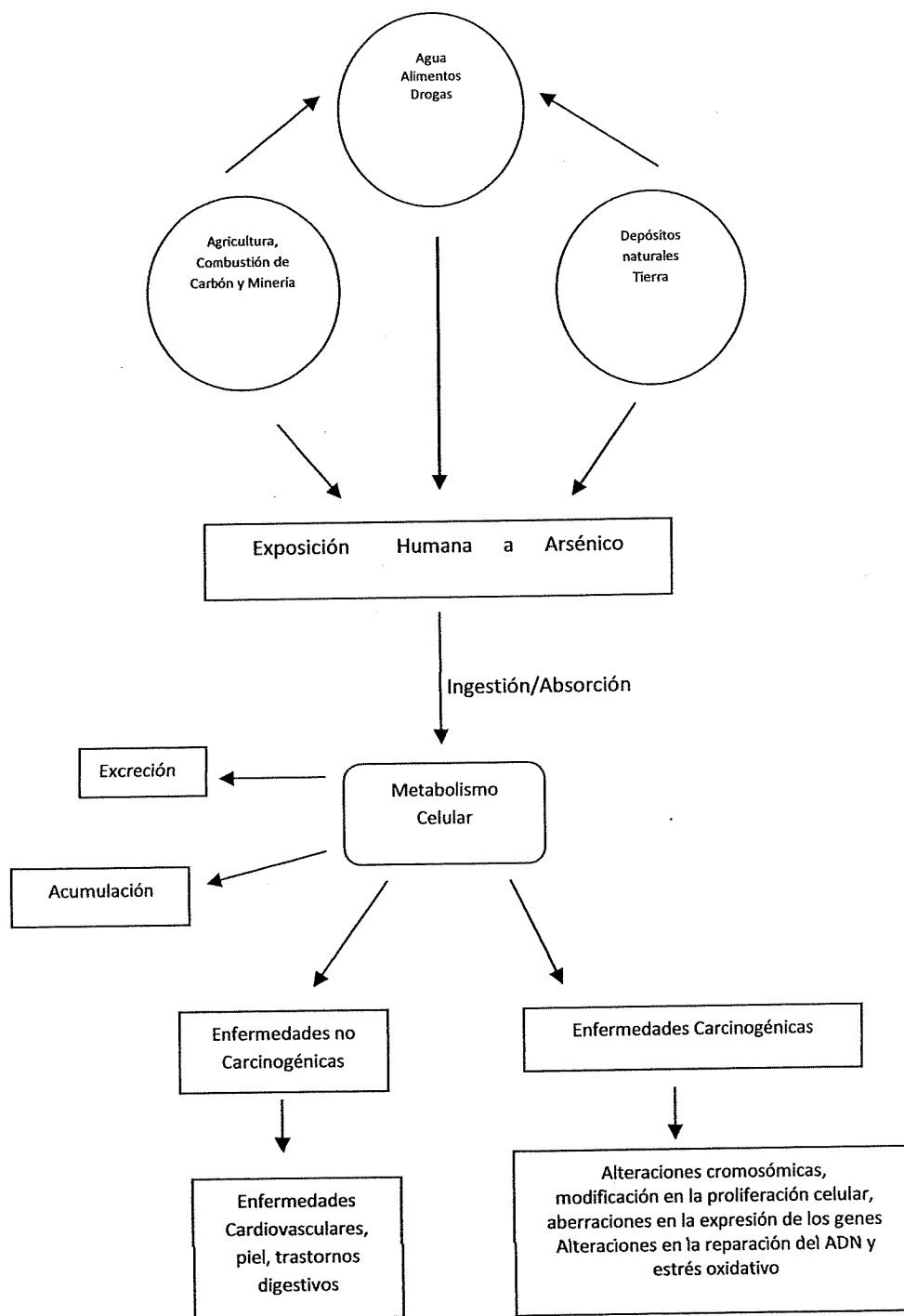


Figura 1. Mecanismos carcinogénicos del arsénico (Adaptado de Pradosh y Anupama, 2002)

Los mecanismos por los cuales el arsénico actúa como carcinogénico es promoviendo la ruptura de las cadenas de ADN (clastogénico), causando aberraciones cromosómicas como deleciones terminales o dicéntricas, anillos, translocaciones, inversiones y la más frecuente la fragmentación de los mismos. La inestabilidad de los cromosomas es característica de las displasias y lesiones premalignas, siendo parte de la secuencia de los eventos necesarios para desarrollar neoplasias, activando los oncogenes o inhibiendo los genes supresores del cáncer (Anwar, 1991). Las mutaciones cromosómicas en las células somáticas incrementan la carcinogénesis porque se generan células con alteraciones en la proliferación, formando clones de células aberrantes. Estas células se van acumulando y progresan hasta convertirse en cáncer después de un periodo de latencia de varios años. El arsénico también inhibe las enzimas antioxidantes como la catalasa, la glucosa 6 fosfato deshidrogenasa y la glutatión peroxidasa, promueve y aumenta la generación de radicales libres como los peróxidos, superóxidos e hidróxidos que actúan directamente rompiendo las cadenas de ADN e inhibiendo su reparación, generando células mutantes (Gosh *et al.*, 2008,. Pradosh y Anupama, 2002).

Existen diversos estudios que miden el riesgo para desarrollar cáncer en ciertas poblaciones expuestas a genotóxicos. Biomonitorizar a la población humana se ha vuelto esencial para determinar si un agente químico es carcinogénico y su principal objetivo es definir a que concentraciones o dosis. Estos estudios son relevantes debido a que se buscan efectos tempranos en

personas expuestas, especialmente con un riesgo laboral elevado como mineros (Anwar, 1991).

Los métodos que miden los daños citogenéticos de las sustancias genotóxicas analizan el efecto directo sobre las células somáticas *in vivo* e *in vitro* y los más utilizados son:

Técnica clásica citogénetica, mediante la tinción de los cromosomas para evaluar daños mutagénicos en las células. Es rápida y se analiza el número de cromosomas y se registra el daño estructural. En personas expuestas a químicos se muestran aberraciones como es la ruptura cromosómica. La desventaja es su costo elevado y la técnica no está disponible para usarse en un gran número de personas.

Técnica Arlequín que se utiliza para detectar alteraciones cromosómicas de cromátidas hermanas en una célula, maneja dosis mucho más bajas que la técnica clásica, mide daños sobre el ADN y se utiliza para hacer monitoreo en grandes poblaciones (Anwar, 1991)

Técnica de micronúcleos que se emplea para detectar alteraciones en las células exfoliadas de las capas epiteliales (mucosa oral y vejiga). La técnica muestra las poblaciones directamente expuestas a carcinogénicos que incrementa las aberraciones cromosómicas de 1 a 3 semanas después de la exposición. Los micronúcleos son porciones de cromosomas acéntricos o cromosomas completos que no se incorporaron al núcleo en la división celular

(Anwar, 1991). El número de micronúcleos sirve como un índice apropiado de monitoreo en la población expuesta al arsénico (Anwar, 1991, Gosh *et al.*, 2008).

La técnica de micronúcleos con bloqueo de la citocinesis en cultivo de leucocitos humanos tiene la misma sensibilidad que la técnica clásica y permite observar los daños cromosómicos, además del daño directo sobre el huso mitótico (efectos aneugénicos). El bloqueo de la citocinesis (división celular), se lleva a cabo gracias a la citocalasina B, generando células binucleadas. La técnica es muy apropiada para evaluar daños por agentes tóxicos, ya que detecta el incremento de micronúcleos y aberraciones cromosómicas como puentes y protuberancias nucleares, de una manera rápida y sencilla, sin exponer directamente al individuo (Anwar, 1991).

Ghosh *et al.* (2008), describe la técnica de micronúcleos en el cultivo de linfocitos de sangre periférica, como una técnica social y éticamente aceptable. La formación de micronúcleos es directamente proporcional con las dosis del agente genotóxico, sin embargo, las altas concentraciones de arsénico inhiben la proliferación celular (citotóxico). Estos investigadores concluyen que esta técnica es la más apropiada para medir los daños genotóxicos del arsénico y otras sustancias con efectos citotóxicos.

Por otra parte, los antioxidantes fitoquímicos son sustancias que retardan el proceso de oxidación, inhiben la polimerización de las cadenas iniciadas por los

radicales libres y otras reacciones oxidativas y al mismo tiempo ayudan a prevenir el cáncer (Zhou *et al.*, 2008). Mientras que las sustancias antígenotóxicas o quimiopreventivos, son aquellas que actúan inhibiendo los efectos de los carcinogénicos. Estas sustancias son eficaces porque revierten las lesiones premalignas o precancerosas cuando se utilizan por largos periodos de tiempo y reaparecen al suspender dicho tratamiento (Rosin, 1993). Se pueden utilizar como preventivas en suplementos alimenticios y terapéuticas para tratar de eliminar los agentes carcinogénicos e inhibir el desarrollo del cáncer (Zhou *et al.*, 2008).

Los mecanismos de inhibición de la carcinogénesis se dividen en tres categorías (Wattenberg, 1985):

1. Previenen la formación del carcinogénico a partir de sustancias precursoras (ácido ascórbico).
2. Inhiben carcinogénesis previniendo que los carcinogénicos alcancen órganos blanco, también llamados agentes bloqueadores (fenoles, indoles).
3. Inhiben o suprimen la expresión neoplásica en las células previamente expuestas a los carcinogénicos (selenio, retinoides y carotenoides).

Las células al contacto con sustancias carcinogénicas producen estrés oxidativo que causan daño directo sobre el ADN. Existen sustancias antioxidantes que disminuyen el estrés oxidativo, protegen inhibiendo los

radicales libres, y activando el sistema antioxidante celular (Leite-Silva *et al.*, 2007). Algunos extractos de plantas terrestres presentan efectos anticancerígenos como es el caso de la plantas de *Bidens pilosa* (Sundararajan *et al.*, 2006), y antigentóxicos como la *Curcuma longa*; esta ultima tiene efectos contra el arsénico ya que disminuye los radicales libres, la peroxidación lipídica, aumenta las enzimas de la fase 2 de detoxificación, como la glutatión transferasa y aumenta la expresión de las polimerasas encargadas de la reparación del ADN (Mukherjee *et al.*, 2007). Los polisacáridos de la plantas como *Aloe barbadensis*, *Letinus edodes*, *Genoderma lucidum* y *Coriolus versicolor* tienen propiedades antigenotóxicas porque inhiben la formación de radicales libres como el anión superóxido (Kim *et al.*, 1999).

También se ha comprobado que los extractos de diversas algas marinas tienen actividades antivirales (Baba *et al.*, 1988, Hudson *et al.*, 1999, Huleihel *et al.*, 2000), disminuyen los niveles de colesterol y lípidos en sangre (Penzahan *et al.*, 2003) y tienen actividad anticancerígena como el extracto acuoso de *Fucus vesiculosus* que presenta efectos antigenotóxicos contra la doxirubicina (Leite-Silva *et al.*, 2006). Otros compuestos que se obtienen de las algas marinas son los fucanos, polisacáridos sulfatados obtenidos de diversas algas que presentan efectos antitumorales, anticancérgenos, antimetastásicos, fibrinolíticos, antivirales, antioxidantes e inhiben la proliferación celular (Smit, 2004, Rocha de Souza *et al.*, 2006). Los polisacáridos de las algas pardas *F. vesiculosus* (Fucoidan), presentan efectos hepatoprotectores contra el tetracloruro de

carbono, como inhibidor de la fibrosis (Leite-Silva *et al.*, 2007) y *Sargassum wightii* como antioxidante contra la ciclosporina (Josephine *et al.*, 2008).

Las algas rojas *Symphycladia latiuscula*, *Rhodomela confervoides*, *Polysiphonia urcedata*, *Gloiopeltis furcata* y *Kappaphycus striatum*, exhiben efectos antitumorales, las algas pardas *Leathesia difformes*, *Punctaria latifolia* y *Scytosiphon lomentaria* y el alga verde *Ulva pertusa* tienen efectos citotóxicos con células sanas y tumorales (Xu *et al.*, 2004). Las algas verdes de la familia *Ulvaceae*, presentan polisacáridos muy similares a los que se encuentran en algas pardas y se le conoce como Ulvan. El Ulvan se ha utilizado en estudios previos y ha demostrado tener efectos antioxidantes (Qi *et al.*, 2005).

El alga verde *Ulva clathrata* es muy abundante en las costas del pacífico con distribución desde Oregón, EUA hasta Sinaloa, México. Esta alga posee de 5 a 12 % de polisacáridos sulfatados en su materia orgánica, estos polisacáridos muestra gran similitud con los extractos de algas pardas como el fucoidan. (Hernández-Garibay *et al.*, 2006). Los polisacáridos pueden variar sus características de acuerdo al método de extracción y de acuerdo a las condiciones físicas y químicas a las que estuvo expuesta el alga. Por ello, utilizar polisacáridos sulfatados con menor peso molecular ha demostrado mayor actividad antioxidante (Zhou *et al.*, 2008).

Por lo anterior, esta investigación se utilizaron los polisacáridos sulfatados hidrosolubles de bajo peso molecular del alga verde *U. clathrata* al cultivarla

bajo condiciones controlada a temperaturas de 28 °C, condición ambiental en la que se generan este tipo de cadenas (Meza-Soria, 2008, Lahay y Robic, 2007 y Qi *et al.*, 2005). Posteriormente se utilizará la técnica de micronúcleos, que es la más apropiada para medir el daño citogenético de una sustancia bioactiva, la más sencilla, económica y rápida además permite ver la interacción entre el agente genotóxico y el polisacárido sulfatado directamente con la célula (Kim *et al.*, 1999).

OBJETIVOS

OBJETIVO PRINCIPAL

1. Determinar si los polisacáridos sulfatados de *Ulva clathrata* inhiben el daño genotóxico en cultivo de leucocitos humanos expuestos al arsenito de sodio.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

1. Evaluar dosis respuesta de la concentración de los polisacáridos sulfatados del alga verde *U. clathrata* y el arsenito de de sodio en la formación de micronúcleos en el cultivo de linfocitos humanos.
2. Evaluar dosis respuesta en base al índice nuclear y el número micronúcleos del cultivo de leucocitos (control negativo).
3. Evaluar dosis respuesta de la concentración de los polisacáridos sulfatados de *U. clathrata* en leucocitos sin arsenito de sodio.
4. Evaluar dosis respuesta del arsenito de sodio sin polisacáridos sulfatados (control positivo).

HIPÓTESIS

1. Los polisacáridos sulfatados de *Ulva clathrata* tendrán efecto protector contra el daño genotóxico inducido por el arsenito de sodio en leucocitos humanos.
2. Los polisacáridos sulfatados no presentaran efectos genotóxicos en los leucocitos humanos.

2. METODOLOGÍA

2.1. Cultivo de Macroalga, Extracción del Polisacárido Sulfatado y Preparación del Arsenito de Sodio

El alga verde *Ulva clathrata* se obtuvo del cepario del Instituto de Investigaciones Oceanológicas de la Universidad Autónoma de Baja California. El alga se cultivo por crecimiento vegetativo en medio Pravasoli's modificado sin antibiótico y sin dióxido de germanio. El agua de mar se filtró, se pasó por rayos ultravioleta, se volvió a filtrar a 45 y 22 μm , se esterilizó y se le agregaron 1 mL de vitaminas, nitritos y fosfatos por cada litro. Se aisló, se cultivó en un incubador a 12 °C con fotoperiodo largo de 14 horas luz y 10 horas oscuridad. Cada 15 días se aumentó la temperatura gradualmente hasta llegar a 28 °C. El recambio de agua se realizó cada tres días (Figura 2).



Figura 2. a. Obtención del alga del cepario del IIO, b. selección y c. cultivo algal.

Una vez que llegó a los 28 °C, el alga permaneció en esas condiciones por tres semanas con crecimiento vegetativo. Posteriormente, la biomasa obtenida

se extrajo, se secó con papel secante, se pesó y colocó en una estufa a 60 °C, por tres días.

Posteriormente se obtuvo el peso seco, se trituro con mortero manualmente, se colocó en un vaso de precipitado con agua, con 10 volúmenes de acuerdo al volumen del peso seco, se calentó a 60 °C por una hora en constante movimiento. A continuación, se separó el sólido del líquido con un filtro *shark skin*. El líquido se precipitó con tres volúmenes de alcohol al 100 %, se centrifugó por 10 minutos a 2,500 RPM, se decantó y se lavó con alcohol al 70%, tres veces. Por último, se agregó alcohol al 100 %, se centrifugó, decantó y se puso a secar a 60°C. Esta porción se pesó y se diluyó con el medio de cultivo RPMI-1640 (HEPES médium), hasta obtener tres concentraciones del alga marina, 0.1, 0.5 y 1mgL⁻¹.

Preparación del arsenito de sodio

Este se preparó a una concentración 1 molar, luego se generaron tres alícuotas con concentraciones de 100, 500 y 1000 µM.

2.2. Selección de los participantes

Las personas que participaron en este estudio fluctuaron entre los 20 y 35 años de edad, masculinos, no fumadores, sin antecedentes de cáncer familiar, no expuestos a genotóxicos (fertilizantes o plaguicidas), sin padecer enfermedades y no estar bajo ninguna medicación en el momento de la obtención de la muestra.

Antes de iniciar los experimentos, se solicitó la evaluación del protocolo por el comité de ética del hospital militar regional (Anexo 1). La toma de la muestra en cada individuo, se realizó después de que estuvieron enterados del protocolo, y el objetivo del experimento. Previo a la toma de muestra los participantes firmaron el consentimiento informado y se les realizó un examen médico para constatar su estado de salud (Anexo 2 y 3).

2.3. Obtención, siembra y fijación de los leucocitos

Extracción de sangre

La toma de muestra se realizó por una venopunción en el brazo, con el participante en ayunas. Se obtuvieron 20 mL en dos tubos con heparina de sodio (BD Vacutainer, sodium heparin 143 USP units, ref. 367874) (figura 3).



Figura 3. Extracción de sangre por venopunción en el brazo.

Siembra de Cultivo

La sangre se sembró inmediatamente después de su obtención. El cultivo se realizó en tubos de 15mL, de poliestireno cónicos, estériles y especiales para cultivo con tapadera. Cada tubo se preparó con 6.3mL de medio de cultivo RPMI-1640 (HEPES médium), suplementado con 1% aminoácidos no esenciales, 1% L-glutamina, 0.2mL de Fitohemaglutinina (Sigma L 8902) y 0.5mL de sangre total.

La siembra se realizó bajo una campana de flujo laminar. Cada tubo se mezcló suavemente con vortex a baja velocidad, después se colocó en una gradilla con una inclinación de 45° y se incubó por 48 hrs a 37 °C (Figura 4).

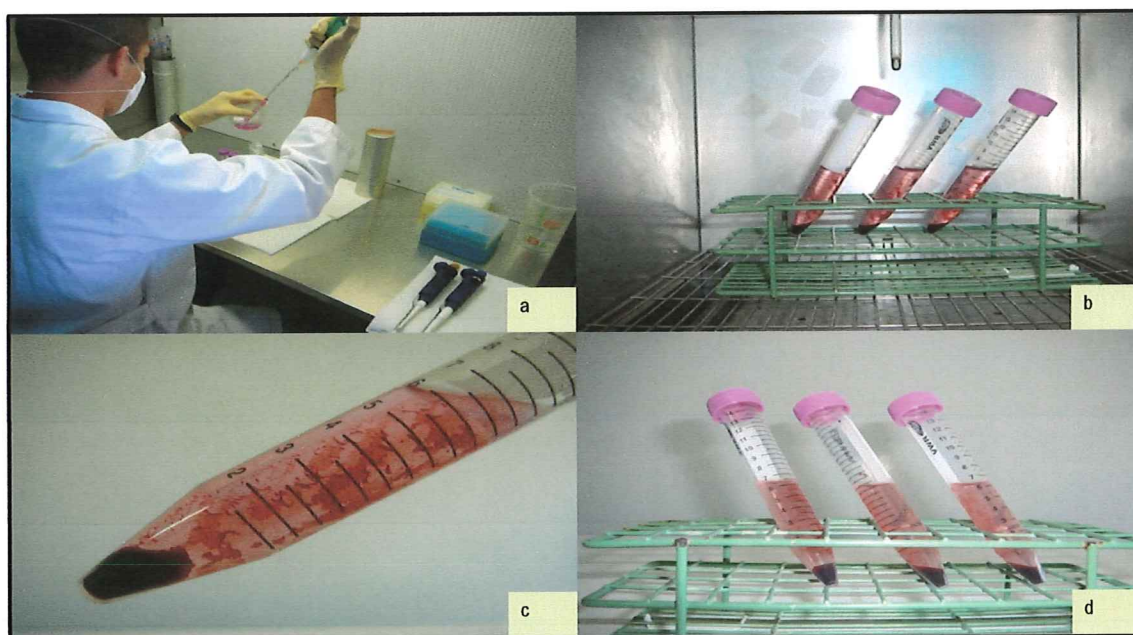


Figura 4. a. La siembra se efectuó en condiciones de esterilidad, usando una campana de flujo laminar. b, c y d, muestran el estado de los cultivos: b. 24

horas después de la siembra, c. 48 horas después de la siembra antes de efectuar el bloqueo de la citocinesis y d. 72 horas después de la siembra, antes de cosechar las células.

Bloqueo de la citocinesis

A cada tubo se le agregaron 0.21 μ L de citocalasina B para inhibir la citocinesis, el polisacárido sulfatado, y arsénico a diferentes concentraciones. Posteriormente, se mezcló en un vortex a baja velocidad para homogenizar. Los tubos se incubaron por 24 horas a 37 °C (Figura 5).



Figura 5. Bloqueo de la proliferación celular: a. adición de citocalasina-B, arsenito de sodio y polisacárido sulfatado, b. y c. mezcla del reactivo con el medio de cultivo celular.

Cosecha

Previo a la cosecha, se preparó una solución de ácido acético y metanol glacial en proporción de 3:1, la que se enfrió a 4 °C por media hora. Con una pipeta automática se resuspendieron las células suavemente, se vació el

contenido en tubos de ensayo de vidrio de 15mL y se les agregó 1mL de fijador. Se tapó el tubo con microfilm, se mezcló suavemente y se centrifugaron a 1,200 RPM por 10 minutos. El sobrenadante se extrajo con una pipeta de 5mL, cuidando de no tomar el botón de células que sedimentó en el fondo de los tubos. Se lavaron las células con 5mL de fijador, se centrifugaron a 1,200 RPM por 10 min y se extrajo el sobrenadante. Cada tubo se lavó 6 veces hasta que el botón celular se mostraba claro dejando 1mL de fijador. El cual se tomó con una micropipeta de 1mL y las células se esparcieron en ziz-zag sobre el portaobjetos previamente frio y rotulado (Figura 6 y 7).

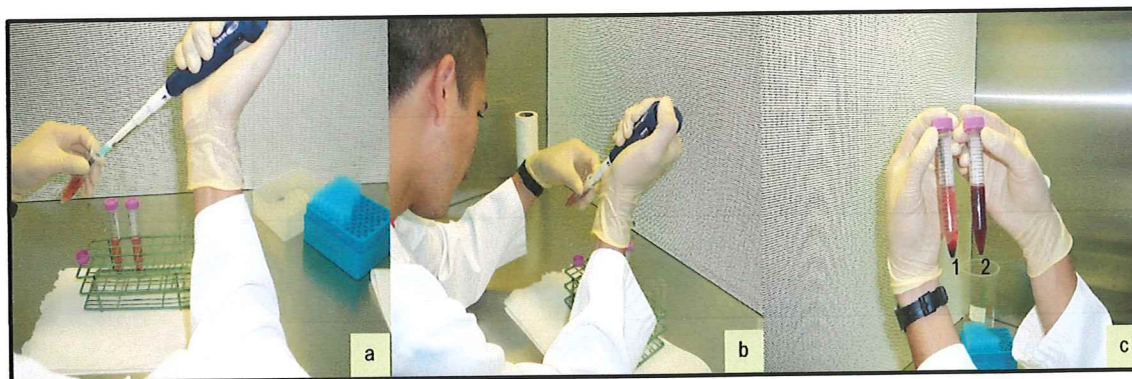


Figura 6 a. y b. Resuspensión del botón celular con una pipeta automática de 1mL. c. Tubo 1 cultivo celular sin resuspender y tubo 2 cultivo celular resuspendido.



Figura 7. a. y b. Fijación y lavado del botón celular con ácido acético y metanol.
c. colocación del botón celular en portaobjetos.

2.4. Tinción y lectura de las laminillas

Las laminillas se secaron a temperatura ambiente por 24hrs. La tinción se realizó con eosina y azul de metileno, para ello se sumergió cada laminilla por 1 minuto en eosina y otro en azul de metileno, posteriormente cada laminilla se enjuagó con agua destilada; se dejó secar en posición vertical por 24 hrs, posteriormente se leyó al microscopio óptico compuesto (Figura 8).



Figura 8. a. Tinción de laminillas, b. lectura de laminillas al microscopio óptico compuesto.

Para este experimento se realizaron tres réplicas por tratamiento y dos experimentos por replica. Los leucocitos presentes en la sangre de cada individuo se expusieron a 16 tratamientos donde se incluyó un control positivo y negativo (Tabla II).

Tabla II. Combinaciones de arsenito de sodio y polisacárido sulfatado a los que se sometieron los cultivos de leucocitos.

Tratamiento	Arsenito de sodio (NaAsO ₂ μ molar)	Polisacárido Sulfatado mgL ⁻¹
1	0	0
2	0	100
3	0	500
4	0	1000
5	100	0
6	100	100
7	100	500
8	100	1000
9	500	0
10	500	100
11	500	500
12	500	1000
13	1000	0
14	1000	100
15	1000	500
16	1000	1000

La lectura de las laminillas se realizó con un microscopio óptico obteniéndose células mononucleadas (M1), binucleadas (M2) y polinucleadas (M3). La proporción de los tres tipos de células (M1, M2 y M3), se utilizó para calcular el índice nuclear (IN). Donde N fue el número de células contadas.

$$IN = [(M1) + 2(M2) + 3(M3)] / N$$

El índice mitótico o índice de proliferación celular se utilizó para determinar si existió multiplicación celular. Un índice normal se considera entre 1.3 y 1.7. Si es menor a 1.3 significa que no hubo proliferación y si es mayor, que hubo incremento en la división celular.

Una distribución de micronúcleos de cero a tres en laminilla es evidencia de persona sana. Este número se incrementa en proporción a la exposición a agentes genotóxicos y con la edad de la persona.

La frecuencia de micronúcleos, puentes nucleoplásmicos y yemas o protuberancias nucleares, se miden por cada 1000 células binucleadas. El criterio de selección para las células binucleadas y frecuencia de micronúcleos es la siguiente:

La célula debe ser binucleada; los dos núcleos deben tener intacta su membrana nuclear y deben estar dentro de la membrana citoplasmática; deben ser de un tamaño similar, intensidad de tinción y misma textura; se pueden tocar entre ellos a través de un puente neoplásmico, que no es más grueso que la cuarta parte del diámetro nuclear; no se deben sobreponer, a menos que ambas membranas nucleares se distingan claramente; se debe distinguir su membrana citoplasmática y debe estar separada de las demás células adyacentes. Los micronúcleos deben medir entre $1/16$ y $1/3$ del diámetro de los núcleos principales en una célula binucleada; no deben ser refractarios y se deben distinguir de corpúsculos como partículas teñidas (basura); no deben estar tocando los núcleos principales; su membrana no debe estar sobre los núcleos principales o debe distinguirse claramente; deben tener la misma intensidad y textura que los núcleos principales; sus puentes deben medir un $1/4$ de diámetro de los núcleos principales y con las mismas características de tinción y textura (Fenech, 2000) (Figura 9 y 10).

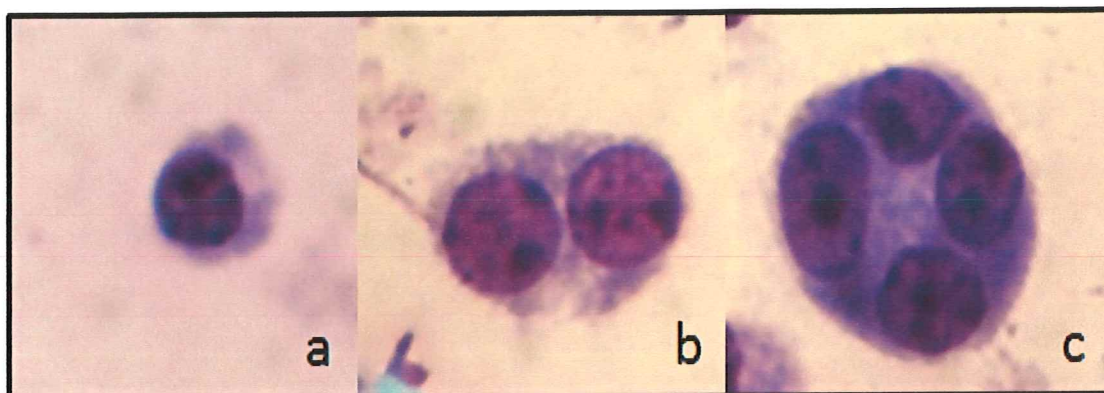


Figura 9. a. Célula mononucleada b. célula binucleada c. célula multinucleada.

x

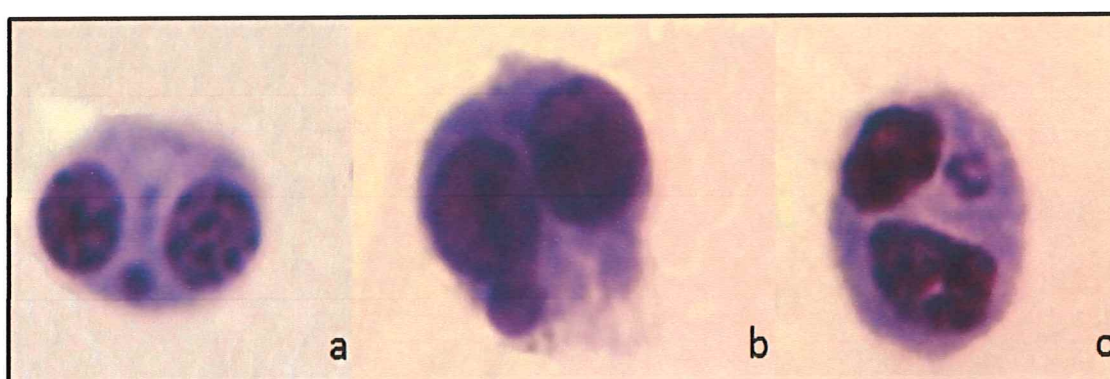


Figura 10. a. célula binucleada con micronúcleo, b. célula binucleada con yemas c. célula binucleada con micronúcleo y apoptosis temprana.

Cada variable se analizó estadísticamente por medio de ANDEVAS de dos vías, se realizaron análisis *a priori* de homocedasticidad y se utilizó el análisis *a posteriori* de Tukey para determinar las diferencias por índice nuclear y número de micronúcleos con ayuda del programa SigmaStat (SYSTAT v. 3.5; Zar, 1999).

3. RESULTADOS

El índice de proliferación celular se mantuvo entre los rangos de 1.25 y 1.63 ± 0.06 . Los tratamientos más estables se presentaron cuando no se utilizó arsenito de sodio (Tabla III).

Tabla III. Estadística básica del índice de proliferación celular

Tratamiento	Arsenito de sodio (NaAsO_2 μmolar)	Polisacárido Sulfatado mgL^{-1}	Índice Nuclear Media	Error estándar	Casos
1	0	0	1.50	0.06	6
2	0	0.1	1.58	0.06	6
3	0	0.5	1.56	0.06	6
4	0	1	1.53	0.06	6
5	0.1	0	1.54	0.06	6
6	0.1	0.1	1.53	0.06	6
7	0.1	0.5	1.36	0.06	6
8	0.1	1	1.39	0.06	6
9	0.5	0	1.43	0.06	6
10	0.5	0.1	1.61	0.06	6
11	0.5	0.5	1.50	0.06	6
12	0.5	1	1.63	0.06	6
13	1	0	1.36	0.06	6
14	1	0.1	1.31	0.06	6
15	1	0.5	1.44	0.06	6
16	1	1	1.25	0.06	6

Los resultados mostraron homocedasticidad ($P=0.085$). El ANDEVA de dos vías evidenció solo diferencias en el arsenito de sodio. La prueba *aposteriori* Tukey's muestra que el índice de proliferación disminuyó significativamente cuando se utilizó la concentración más alta de NaAsO_2 ($1000\mu\text{M}$).

El polisacárido no presentó diferencias significativas sobre el índice de proliferación (Tabla IV y V, Figuras 11 y 12).

Tabla IV. ANDEVA de dos vías que evidencia los efectos del Arsenito de sodio y el PSS sobre el índice de proliferación celular.

Fuente de Variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados Medios	F	P	Significancia
NaAsO_2	3	0.662	0.221	9.414	<0.001	*
PSS	3	0.045	0.015	0.64	0.592	NS
NaAsO_2 vs PSS	9	0.419	0.0466	1.987	0.052	NS
Residuo	80	1.874	0.0234			
Total	95	3	0.0316			

*= significativo

NS= No significativo

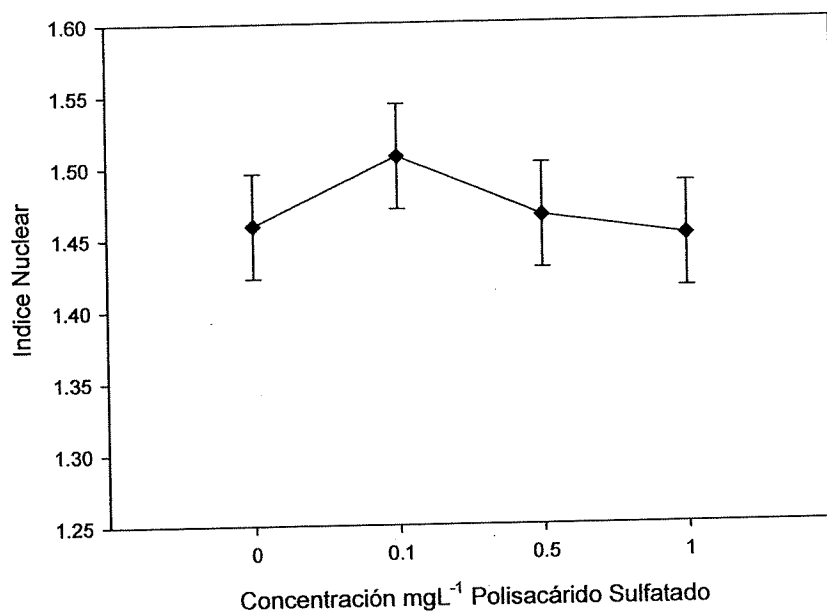


Figura 11. Efecto del PSS sobre el índice nuclear. $\pm$ IC a 0.95%.

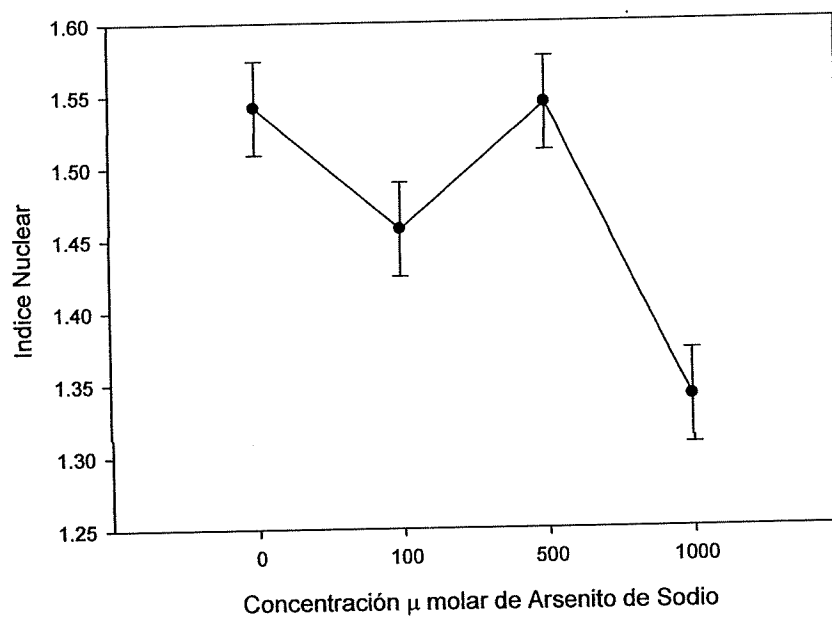


Figura 12. Efecto del NaAsO₂ sobre el índice nuclear. $\pm$ IC a 0.95%.

Tabla V. Comparación múltiple Tukey por el factor Arsenito de sodio sobre el índice de proliferación celular.

Comparación NaAsO ₂ y PSS	Diferencias Media	p	q	P	P<0.050
500 vs 1	0.204	4	6.514	<0.001	S
500 vs 0.1	0.0868	4	2.778	0.21	NS
500 vs 0	0.00221	4	0.0707	1	NS
0 vs 1	0.201	4	6.444	<0.001	S
0 vs 0.1	0.0846	4	2.707	0.23	NS
100 vs 1	0.117	4	3.737	0.048	s

S= Significativo

NS= No significativo

El número de Mn se mantuvo entre los rangos de 3.67 y 69.33 ± 3.46 . Los tratamientos más estables se presentaron cuando no se utilizó NaAsO₂ ni el PSS. El número de Mn se incrementó cuando se utilizaron los tratamientos independientes (solo NaAsO₂ o solo PSS). El incremento más notable se encontró cuando el NaAsO₂ fue de 1000µM y el PSS fue de 100mgL⁻¹ (Tabla VI).

Tabla VI. Estadística básica del número de Micronúcleos.

Tratamiento	NaAsO ₂ [μ M]	Polisacárido Sulfatado [mgL ⁻¹]	Micronúcleos Promedio	Error estándar	Casos
1	0	0	3.67	3.46	6
2	0	0.1	19.83	3.46	6
3	0	0.5	19.17	3.46	6
4	0	1	13.50	3.46	6
5	100	0	19.67	3.46	6
6	500	0	19.50	3.46	6
7	1000	0	21.83	3.46	6
8	100	0.1	34.67	3.46	6
9	100	0.5	32.00	3.46	6
10	100	1	35.00	3.46	6
11	500	0.1	32.33	3.46	6
12	500	0.5	33.83	3.46	6
13	500	1	30.00	3.46	6
14	1000	0.1	69.33	3.46	6
15	1000	0.5	34.17	3.46	6
16	1000	1	33.17	3.46	6

Los resultados mostraron homocedasticidad ($p=0.306$). El ANDEVA de dos vías evidenció diferencias significativas tanto para el NaAsO₂ como para el PSS y los tratamientos combinados. La Prueba *aposteriori* Tukey's muestra que el tratamiento de 1000 μ M de Arsenito de Sodio es diferente del tratamiento con 0 y 500 μ M (Tabla VII y VIII, Figuras 13,14 y 15).

Tabla VII. ANDEVA de dos vías que evidencia los efectos de las diferentes concentraciones del Arsenito de sodio y los polisacáridos sulfatados sobre el número de micronúcleos.

Fuente de Variación	Grados de libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrados medios	F	P	Significancia
NaAsO ₂	3	19.145	6.382	50.328	<0.001	*
PSS	3	12.63	4.21	33.201	<0.001	*
NaAsO ₂ vs PSS	9	4.913	0.546	4.305	<0.001	*
Residuo	80	10.144	0.127			
Total	95	46.831	0.493			

* = significativo

NS = No significativo

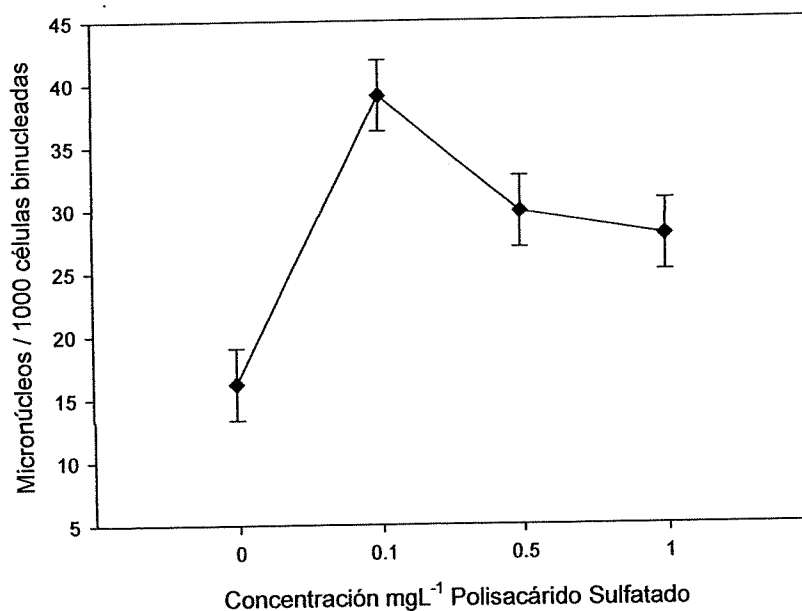


Figura 13. Efecto del polisacárido sulfatado (PSS), sobre el número de micronúcleos. $\pm$ IC a 0.95%.

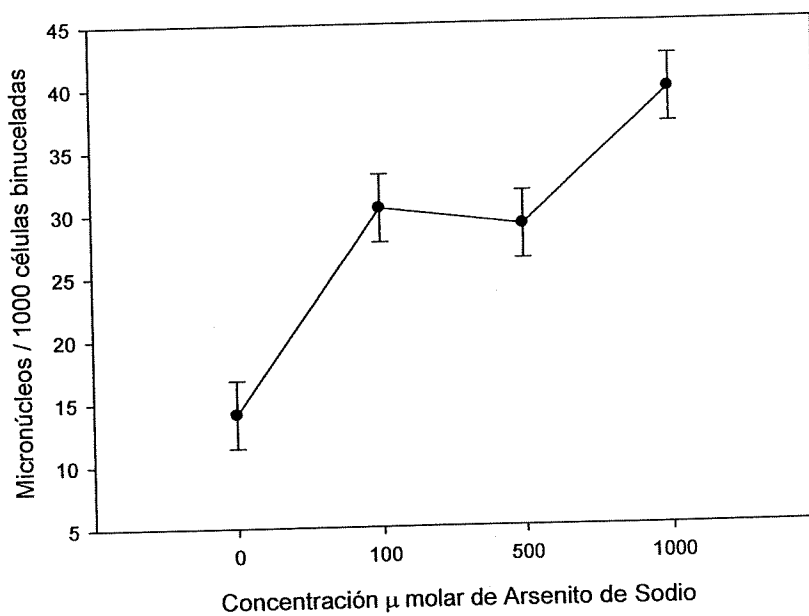


Figura 14. Efecto del arsenito de sodio (NaAsO_2), sobre el número de micronúcleos. $\pm$ IC a 0.95%.

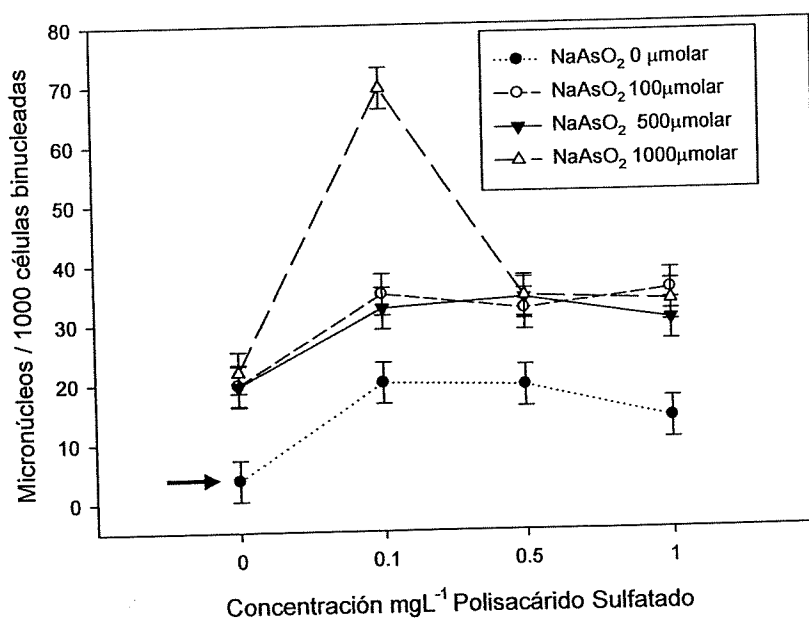


Figura 15. Efecto combinado del PSS y NaAsO_2 sobre el numero de Mn. $\pm$ IC a 0.95%. El testigo o blanco corresponde a 0 del PSS y 0 del NaAsO_2 (3.67 ± 3.46 flecha $\rightarrow$)

Tabla VIII. Comparación múltiple por Tukey's por el factor Arsenito de sodio sobre el número de micronúcleos.

Comparación NaAsO_2 y PSS	Diferencias medias	p	P	$P < 0.050$	Significancia
1000 y 0	1.157	4	15.915	<0.001	*
1000 y 0.5	0.235	4	3.233	0.11	NS
1000 y 0.1	0.206	4	2.833	0.196	NS
100 y 0	0.951	4	13.083	<0.001	*
100 y 0.5	0.0291	4	0.4	0.992	NS
500 y 0	0.922	4	12.682	<0.001	*

* = significativo

NS = No significativo

En los tratamientos individuales, la prueba *aposteriori* de Tukey's, arrojó diferencias significativas cuando la concentración del NaAsO_2 es de 100 μM , en los tratamientos combinados con 0.5 y 1 mgL^{-1} del PSS (Tabla IX).

Tabla IX. Comparación multiple Tukey's por el factor Arsenito de Sodio a una concentración de 100µM sobre el número de Mn.

Comparación NaAsO ₂ y PSS	Diferencias medias	p	P	P<0.050	Significancia
100 y 0	1.281	4	8.81	<0.001	*
100 y 0.5	0.78	4	5.369	0.002	*
100 y 1	0.746	4	5.134	0.003	*
1000 y 0	0.534	4	3.676	0.053	NS
1000 y 0.5	0.0341	4	0.235	0.998	NS
500 y 0	0.5	4	3.441	0.079	NS

* = significativo

NS = No significativo

La Prueba *aposteriori* Tukey's muestra que existen diferencias significativas cuando el PSS estuvo a concentraciones de 0.5 y 1mgL⁻¹ sobre el número de Mn (Tabla X).

Tabla X. Comparación múltiple por Tukey's por el factor del PSS sobre el numero de Mn.

Comparación NaAsO ₂ y PSS	Diferencias media	p	P	<i>P</i> <0.050	Significancia
100 y 0	0.983	4	13.518	<0.001	*
100 y 1	0.288	4	3.967	0.032	*
100 y 0.5	0.277	4	3.816	0.042	*
500 y 0	0.705	4	9.702	<0.001	*
500 y 1	0.011	4	0.151	1	NS
1000 y 0	0.694	4	9.551	<0.001	*

* = significativo

NS = No significativo

En los tratamientos individuales, la prueba *a posteriori* de Tukey, arrojó diferencias significativas cuando el PSS esta a concentraciones de 0.5 y 1mgL⁻¹ del PSS y el NaAsO₂ a 100μM de (Tabla XI).

Tabla XI. Comparación múltiple por el factor del PSS a una concentración de 1mgL⁻¹ sobre el número de Mn.

Comparación NaAsO ₂ y PSS	Diferencias medias	p	P	P<0.050	Significancia
100 y 0	1.18	4	8.12	<0.001	*
100 y 0.5	0.833	4	5.731	<0.001	*
100 y 1	0.744	4	5.121	0.003	*
1000 y 0	0.436	4	2.999	0.156	NS
1000 y 0.5	0.0886	4	0.61	0.973	NS
500 y 0	0.347	4	2.389	0.336	NS

* = significativo

NS = No significativo

4. DISCUSSION.

En este estudio se observó que el polisacárido sulfatado del alga verde *Ulva clathrata* no presentó efectos citotóxicos en el cultivo de leucocitos humanos, tal y como se planteó en la hipótesis de este trabajo. Su inocuidad, se evidenció al no inhibir la proliferación celular, lo cual coincide con los estudios obtenidos con los extractos acuosos de *Fucus vesiculosus* (Leite-Silva *et al.*, 2007). Lo que demuestra que los extractos de las algas marinas no tienen efecto sobre la mitosis. Resultados diferentes se han encontrado al analizar la propiedades citotóxicas de extractos de *Ulva pertusa* donde si se presentó efectos contra células tumorales y células normales (Xu *et al.*, 2004).

Por otra lado, utilizar arsenito de sodio en el cultivo de leucocitos humanos si presentó características citotóxicas al inhibir la proliferación celular, lo cual coincide con otras investigaciones (Gonsebat *et al.*, 1992). Esto confirma que el arsenito de sodio actúa como aneugénico impidiendo que el huso mitótico se fusione con el cinetocoro paralizando los cromosomas, por lo que no permite que se desplacen en anafase. Se ha demostrado que el arsenito de sodio es un inductor citotóxico y se puede utilizar como control positivo en la inducción genotóxica (Mukherjee *et al.*, 2007; Pradosh y Anupama, 2002).

El polisacárido sulfatado no presentó efectos antigenotóxicos ya que no disminuyó el número de micronúcleos en el cultivo de leucocitos humanos cuando fueron expuestos a diferentes concentraciones de arsenito de sodio. Incluso actuó como genotóxico porque se incrementaron los micronúcleos

cuando solamente se utilizó el polisacárido sulfatado con respecto al testigo o blanco. Experimentos previos han demostrado los polisacáridos sulfatados de *Ulva pertusa*, *Sargassum fusiforme* y *Fucus vesiculosus* presentaron características antioxidantes contrario a lo que se encontro en este estudio (Qi *et al.*, 2005. Leite-Silva *et al.*, 2007; Zhou *et al.*, 2008).

El arsenito de sodio demostró tener actividad genotóxica en el cultivo de leucocitos porque incrementó el número de micronúcleos de manera significativa. Este hallazgo pudiera atribuírse como en otros experimentos al efecto genotóxico que incrementó la longitud de la cola en el ensayo cometa, que se traduce en un daño directo sobre el ADN; incremento en los radicales libres de las especies oxígeno reactivas que son responsables del estrés oxidativo de la célula, incremento en la peroxidación lipídica, disminución de las enzimas como la catalasa, la superóxido dismutasa y la glutatión transferasa, incremento las alteraciones cromosómicas y modificaciones en la expresión de los genes, incrementando el número de micronúcleos e inhibiendo la reparación del ADN (Mukjerjee *et al.*, 2007; Pradosh y Anupama, 2002; Ghosh *et al.*, 2007; Salinikow y Zhitkovich 2009).

Ulva clathrata a pesar de no ser un citotóxico se comportó como un genotóxico, contrario a lo que se demostró con otras algas como *Ulva rigida*, *Ulva fasciata*, *Ulva lactuca*, *Sargassum sp*, *Ecklonia stolonifera*, *Symphocladia latiuscula*, *Ulva rigida* y *Fucus vesiculosus*, que actuaron como antioxidantes, antitumorales y antigenotóxicos (Ruperez *et al.*, 2002; Balaji Raghavendra Rao

et al, 2004; Qi *et al.*, 2006, Kang *et al.*, 2004; Yangthong *et al.*, 2009; Wu *et al.*, 2009; Celickler *et al.*, 2008; Celickler *et al.*, 2009).

En el cultivo de leucocitos humanos expuestos a diferentes concentraciones de arsenito de sodio y el polisacárido sulfatado se demostró un incremento significativo en el número de micronúcleos en relación al control. El polisacárido sulfatado no actuó como antigenotóxico contrario a la hipótesis que se planteó en este trabajo, dado que no disminuyó de manera significativa los micronúcleos con respecto al control. Sin embargo funcionó como amortiguador al reducir los efectos genotóxicos del arsenito de sodio cuando las concentraciones del polisacárido sulfatado fueron de 0.5 y 1.0 mgL⁻¹.

El polisacárido sulfatado del alga verde *Ulva clathrata* no presenta características terapéuticas para tratar las enfermedades ocasionadas por la ingesta o contacto con el arsenito de sodio por sus características genotóxicas.

5. CONCLUSION

El arsenito de sodio fue un potente citotóxico y genotóxico.

El polisacárido sulfatado del alga verde *Ulva clathrata* no actuó como citotóxico.

El polisacárido sulfatado no es un antígenotóxico

El polisacárido sulfatado actuó como amortiguador del arsenito de sodio a concentraciones de 0.5 y 1 mgL⁻¹.

6. LITERATURA CITADA

- Anwar W.A. (1991) Cytogenetic monitoring of human populations at risk in Egypt: Role of cytogenetic data in cancer risk assessment. *Environmental Health Perspectives*, 96: 91-95.
- Anand R., Kunnumakkara A.B., Sundaram C., Harikumar K.B, Tharakan S.T., Lai O.S., Sung B., and Aggarwal B.B.(2008) Cancer is a preventable disease that requires major lifestyle changes. *Pharmaceutical research*, 25 (9): 2097-2116.
- Baba M., Snoeck R., Pauwels R., De Clerq E., (1988) Sulfated Polysaccharides are potent and selective inhibitor of various enveloped viruses, including Herpes Simplex Virus, Cytomegalovirus, Vesicular Stomatitis Virus and Human Immunodeficiency Virus. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 1742-1745.
- Balaji Raghavendra Rao H., Sathivel A., Devaki T. (2004) Antihepatotoxic nature of *Ulva Reticulata* (*Chlorophyceae*) on acetaminophen-induced hepatotoxicity in experimental rats. *Journal Medical Food*, 7(4): 495-7.
- Celickler S., Tas S., Vatan O., Ziyank-Ayvalik S., Yildiz G., Bilaloglu R.(2009) *Food Chemical Toxicology*. 47(8): 1837-40.
- Celickler S., Yildiz G., Vatan O., Bilaloglu R.(2008) *Biomedical Environment Science* 21(6): 492-8.
- Donaldson M. (2004) Nutrition and cancer: A review of evidence for anti-cancer diet. *Nutrition Journal*. 3-19.
- Encarta, 2008 (es.encarta.msn.com/encyclopedia_761572256_2/Cáncer.html)

Fenech M. (2000) The *in vitro* micronucleus technique. Mutation Research 455: 81-95.

Fuentes Díaz , M.,(2005) Arsénico en las incrustaciones en las redes de distribución de agua potable en el norte de México y su desprendimiento. Agua Latinoamérica. Marzo-Abril, 15-17.

Glei, M.,Pool-Zobel, B.L. ,(2006) The main catechin of green tea (-)-epigallocatechin-3-gallate (EGCG), reduces bleomycin-induced DNA damage in human leucocytes. Toxicology *in vitro*, 20 (3), 295-300.

Gonsebatt, M.E., Vega, I., Herrera L.A., Montero R., Rojas, E., Cebrian M.E., Ostrosky-Wegman P. (1992) Inorganic arsenic effects on human lymphocyte stimulation and proliferation. Mutational Research 283(2): 91-95

Gosh P., Basu A., Singh K., and Giri A.(2008) Evaluation of cell types assessment of cytogenetic damage in arsenic exposed population. Molecular Cancer 7:45.

Halliwell, B., Whiteman, M., 2004. Measuring reactive species and oxidative damage *in vivo* and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? British Journal of Pharmacology. 142: 231-255.

Hudson J.B., Kim J.H., Lee M.K., DeWreede R.E., and Hong Y.K. (1999) Antiviral compounds in extracts of Korean seaweed: Evidencie for multiples activities. Journal of Applied Phycology 10: 427-434.

Hernández-Garibay, Rodríguez-Gamboa A., Pacheco-Ruiz I., Guardado-Puentes J., Bautista-Alcantar J. (2006) Polisacáridos sulfatados del alga verde *Enteromorpha clathrata*. V Congreso Nacional de Ficología.

Huarnao ,Y., Jinming S., 2004. Preparation, structural characterization and *in vitro* antitumor activity of *kappa*-carrageenan oligosaccharide fraction from *Kappaphycus striatum*. Journal of Applied Phycology. 17:7-13

Huleihel M., Ishanu V., Tal J., and Arad S. (2001) Antiviral effect of red microalgal polysaccharides on *Herpes simplex* and *Varicella zoster* viruses. Journal Applied Phycology 13: 127-134.

INEGI Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática
(www.inegi.gob.mx/inegi/contenidos/espanol/prensa/Contenidos/estadisticas/2006/cancer06.pdf)

Josephine A. Nithya K., Amudha G., Veena C.K., Preetha S. and Varalakshmi P. (2008) Role of sulphated polysaccharides from *Sargassum wightii* in Cyclosporine A-induced oxidative liver injury in rats. BMC Pharmacology 8:4

Kang H.S., Chung H.Y., Kim J.Y., Son B.W., Jung H.A., Choi J.S. (2004) Inhibitory phlorotannins from the edible brown alga *Ecklonia stolonifera* on total reactive oxygen species (ROS) generation. Archives of Pharmacology Research. 27 (2): 194-8.

Kim H.S., Kacew S. and Lee M. (1999) *In vitro* chemopreventive effects of plant polysaccharides (*Aloe Barbadensis* Miller, *Lentinus edodes*, *Gnoderma lucidum* and *Coriolus versicolor*) Carcinogenesis 20(8): 1637-1640.

Klein C.B., Leszczynska J., Hickey C. y Rossman T.G. (2007). Further evidence against a direct genotoxic mode of action for arsenic-induced cancer. Toxicology Applied Pharmacology 222(3): 289-297.

- Lahaye M. and Robic (2007). A structure and functional properties of Ulvan, a polysaccharide from green seaweeds. *Biomacromolecules* 8(6):1766-1774.
- Leite-Silva C., Silva-Gusmao C. L., Satie-Takahashi C. (2007). Genotoxic and antigenotoxic effects of *Fucus vesiculosus* extract on cultured human lymphocytes using chromosome aberration and Comet assays. *Genetics and Molecular Biology*, 30 (1): 105-111.
- Meza-Soria R. (2008) Efecto de la temperatura en la composición del alga verde *Ulva clathrata* en condiciones de cultivo. Tesis Licenciatura en Oceanología, Universidad Autónoma de Baja California.
- Pengzhan Y., ning L., Xiguang L., Gefei Z., Quabin Z., Pengcheng L. (2003) Antihyperlipidemic effects of different molecular weight sulfated polysaccharide from *ulva pertusa* (clorophyta) *Pahrmacology Research* 48(6) 543-9.
- Pradosh, R. and Anupama, S., 2002. Metabolism and toxicity of Arsenic: A human carcinogen. *Current Science*, 82 (1): 38-45.
- Qi, H., Zhao, T., Zhang, Q., Li, Z. , Zhao, A., Xing, R., (2005). Antioxidant activity of different molecular weight sulfated polysaccharides from *Ulva pertusa* Kjellm (Clorophyta). *Journal of Applied Phycology*, 17:527-534.
- Qi, H., Zhang, Q., Zhao T.Hu R., Zhang K. Li Z., (2006) In vitro antioxidant activity of acetylated and benzoylated derivatives of polyssaccharide extracted from *Ulva pertusa* (*Chlorophyta*). *Bioorganic Medical Chemesty Letters* 16(9): 2441-5.
- Rocha de Souza M.C., Marques CT., Guerra-Dore C.M., Ferreira da Silva F.R., Oliveira-Rocha H.A., Lisboa Leite E. (2007) Antioxidant activities of sulfated

polysaccharides from brown and red seaweeds. *Journal Applied Phycology* 19 (2): 153-160.

Rosin M. (1993) Genetic Alterations in carcinogenesis and chemoprevention. *Enviromental Health Perspectve Supplements* 101:253-256.

Ruperez P., Ahrazem O. y Leal J.A. (2002) Potential antioxidant capacity of sulphated polysaccharides from edible marine brown seaweed *Fucus vesiculosus*. *Journal of Agricultural Food Chemistry* 50(4): 840-5.

Salnikow K. and Zhitkovich A., (2009), Genetica and Epigenetic Mechanisms in Metal Carcinogenesis and cocarcinogenesis: Nickel, Arsenic and Chromium. *Chemical Research in Toxicology*, 21: 28-44.

Smit A. (2004) Medicinal and pharmaceutical uses of seaweed natural products: A review. *Journal of Applied Phycology* 16: 245-262.

Sundararajan P., Dey A., Smith A., Doss A.G., Rajappan M., Natarajan S.(2006) Studies of anticancer and antipyretic activity of *Bidens pilosa* whole plant. *African Health Sciences*. 6 (1): 27-30.

Mukherjee S., Roy M., Dey S., Bhattacharya R., (2007) A mechanistic approach for modulation of Arsenic Toxicity in Human Lymphocytes by Curcumin, an active constituent of medicinal herb *Curcuma longa*. *Journal Clinical Biochemistry Nutrition* 41, 32-42.

Veerapur V.P., Prabhakar K.R. Parihar V.K., Kandadi M.R., Ramakrishana S., Mishra B., Satish Rao B.S., Srinivasan K.K., Priyadarsini K.I. y Unnikrishnan M.K. (2009) *Ficus racemosa* Stem Bark Extract: A potent Antioxidant and a Probable Natural Radioprotector. *eCAM* 6(3), 317-324.

- Vogel F. (1978) Genetic aspects of induced mutation. Human Genetic 1(suppl.): 141-147.
- Warner M., Smith M. Kalman D. I (1994) Increased micronuclei in exfoliated bladder cells of individuals who chronically ingest arsenic-contaminated water in Nevada. Cancer Epidemiology, biomarkers and prevention, 3, 583-590.
- Wattenberg, L. (1985) Chemoprevention of Cancer. Cancer Research, 45, 1-8.
- Wu T.M., Hsu Y.T., Sung M.S. Hsu Y.T. Lee T.M.(2009) Expression of genes involved in redox homeostasis and antioxidant defense in a marine macroalga *Ulva fasciata* by excess copper. Aquatic Toxicology Jul 19 (Epub)
- Xu, N., Fan, X., Yan, X., and Tseng, C.K. (2004). Screening marine algae from China for their antitumor activities. Journal of Applied Phycology, 16: 451-456.
- Yangthong M., Hutadilok- towatana N., Phromkunthong W. (2009) Antioxidant activities four edible seaweeds southern coast of Thailand. Plant Food Human Nutrition, 64 (3):218-23.
- Zhou, J. Hu, N., Wu, Y., Pan, Y. and Sun C. (2008). Preliminary studies on the chemical characterization and antioxidant properties of acidic polysaccharides from *Sargassum fusiforme*. Journal of Zhenjiang University Science B. 9 (9): 721-727.

7. GLOSARIO

Antigenotóxico: Inhibe o revierte el daño de los agentes genotóxicos

Antioxidante: Sustancia que protege las células de los daños que causan los radicales libres.

Arsénico: Elemento químico de la tabla periódica símbolo As y peso atómico 33. Metalloide quebradizo de color gris y brillo metálico.

Biomarcadores: Los marcadores biológicos son los cambios medibles bioquímicos, fisiológicos o morfológicos, que se asocian a la exposición a un tóxico.

Biomonitoreo: Valoración de la exposición humana a químicos ambientales a través de la medición de esos químicos o sus metabolitos en sangre, orina, saliva o tejido.

Cáncer: Es un conjunto de enfermedades ocasionado por la proliferación continua de células con mutaciones secuenciales en el genoma que conduce a la malignización.

Carcinogénico: Sustancia o agente que causa o induce el desarrollo cáncer.

Clastogénico: Son agentes físicos, químicos o biológicos capaces de inducir alteraciones cromosómicas.

Células exfoliadas: Células que se descaman, natural o artificialmente, de las mucosas (oral, vejiga, cervicouterinas)

Ciclosporina: Es un medicamento inmunosupresor utilizado en pacientes con trasplante de órganos.

Citocalasina B: Molécula aislada del hongo *Helminthosporium dematoidium*, que inhibe la polimerización de actina, impidiendo la citocinesis celular a través de la imposibilidad de crear el anillo microfilamentoso para la partición celular. Esta molécula no afecta a las fibras del huso ni a la división del núcleo, permitiendo la observación de células monodividas o binucleadas.

Citóxico: Sustancia toxica para las células.

Cocarcinogenesis: Agente que actúa en células preconditionadas para desarrollar cáncer.

Doxirubicina: Antibiótico antraciclino que ejerce sus efectos sobre las células cancerosas e inhibiendo su proliferación celular.

Fitoheماغlutinina: Es la fracción proteica de los frijoles rojos *Phaseolus vulgaris*, que aglutina eritrocitos y leucocitos e induce a la mitosis de diferentes líneas celulares.

Fucoidan: Polisacárido sulfatado que se encuentra en las algas cafés

Genotóxico: Factores capaces de producir alteración en los genes. Bajo este término se incluyen los agentes que interaccionan tanto directa como indirectamente, con el ADN provocando mutaciones, y los que interfieren en algunos procesos enzimáticos de la reparación, o en la génesis o polimerización del material proteico involucrado en la segregación cromosómica.

In vitro: Experimento científico en un tubo de ensayo o en un ambiente controlado fuera del organismo vivo bajo condiciones controladas en un laboratorio.

In vivo: Experimento científico que se realiza dentro de un organismo vivo

Micronúcleos: cuerpos citoplasmáticos esféricos, detectados en interfase, más pequeños y morfológicamente idénticos al núcleo celular. Se originan a partir de fragmentos acéntricos o cromosomas enteros que se retrasan en la división celular y fallan en su incorporación a los núcleos hijos. Dado que los MN pueden ser expresados solamente en células que han completado un ciclo de división celular, se desarrolló un método que permite la identificación de dichas células por su aspecto binucleado cuando se bloquea la citocinesis mediante el agregado de citocalasina-B, un inhibidor del ensamblaje de los microfilamentos.

Mutagénico: Sustancia o agente que causa mutaciones

Mutaciones: Alteración o cambio en la información genética de un ser vivo

Proliferación celular: Aumento del número de células como resultado del crecimiento y multiplicación celular.

Quimiopreventivo: Sustancias naturales o sintéticas utilizadas para tratar de reducir el riesgo de cáncer, retardarlo o evitar su regresión.

Ulvan: Polisacárido sulfatado derivado de las algas verdes.

8. ANEXOS



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
Instituto de Investigaciones Oceanológicas

"POR LA REALIZACIÓN PLENA DEL HOMBRE"

Ensenada, B. C. a 22 de abril del 2009
Oficio No. 091/09-1

Coronel M. C. Cuauhtémoc Martínez Sánchez
Presidente
Comité de Ética
Hospital Militar Regional
Ciudad.

Por este conducto solicito su intervención para someter al comité, que usted preside, la revisión del protocolo de investigación intitulado: *"Efectos Antigenotóxicos de los Polisacáridos Sulfatados del Alga Verde Ulva clahrata en leucocitos Humanos Expuestos a Arsenito de Sodio"*, así como el consentimiento informado, que será leído y firmado por los voluntarios que participen, de la Médico Dilayaxi Cárdenas Bautista, estudiante del postgrado de esta Institución.

Estamos en la mejor disposición de recibir cualquier sugerencia en relación ambos documentos.

Sin otro particular, les agradecemos su apoyo y atención, me despido de usted con un cordial saludo.

Atentamente,

DR. ISAI PACHECO-RUIZ
Director

Inst. de Invest. Oceanológicas, UABC
Asesor de Tesis

Universidad Autónoma
de Baja California



Instituto de Investigaciones
Oceanológicas

C.c.p. Dr. Asdrúbal Martínez Díaz De León.- Subdirector, Edificio.
Dr. Luis Antonio Cúpol Magaña.- Coordinador de Postgrado e Investigación de la F.C.M., UABC, Campus Ensenada.
Dr. Leopoldo Guillermo Mendoza Espinosa.- Coordinador de Posgrado e Investigación del IIO, UABC, Campus Ensenada.
Comité de Tesis
Médico Dilayaxi Cárdenas Bautista.-Estudiante de Posgrado.
Expediente y Minutario.
IPR/hal@.

Km. 107 Carret. Tijuana-Ensenada, Unidad Universitaria, Ensenada, B.C., C. P. 22860, México
Teléfonos: (646) 174-4601, 174-5475, 174-5462; Fax: (646) 1 74 53 03
E-mail: isai@uabc.mx http://iio.ens.uabc.mx

"2009, Año de la Reforma Liberal"

DEPENDENCIA:	HOSPITAL MILITAR REGIONAL. EL CIPRÉS, B.C.
SECCIÓN:	DEPTO. DE ENSEÑANZA.
MESA:	TRAMITE.
NÚM. OF:	JEI-384.
EXPEDIENTE:	

ASUNTO:- Protocolo de investigación.

Campo Militar 2-A, El Ciprés, B.C. a 15 de junio del 2009.

C. Doctor,
ISAÍ PACHECO RUÍZ.
DIRECTOR DEL INST. DE INVEST. OCEANOLÓGICAS, UABC.
Ensenada, B.C.

ANTECEDENTES:- Of. No. 091/09-1 de fecha 22 Abr. 2009,
emitido por esa Universidad.

Por medio de la presente reciba un cordial y afectuoso saludo, asimismo en relación con el oficio citado en antecedentes, hago de su conocimiento que el comité de ética de este Hospital Militar, sometió a revisión el protocolo de investigación intitulado **"Efectos Antígenos de los Polisacáridos Sulfatados del Alga Verde Ulva clahtrata en leucocitos Humanos Expuestos a Arsenito de Sodio"**, llegando a la conclusión de que se cumple con los requerimientos necesarios para llevarse a cabo, sin tener el comité ningún inconveniente para que se realicen las tomas de muestra previa autorización por los mismos sujetos a prueba.

Sin más por el momento, quedo de usted como su Atento y Seguro Servidor.

SUFRAGIO EFECTIVO. NO REELECCION.
EL SUBDIRECTOR DEL HOSP. MIL. RGNL.

TTE. COR. M.C. JESÚS ROBERTO PIEDRAS TREJO.

GRG-jrog.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
POSGRADO EN ECOLOGÍA MOLECULAR Y BIOTECNOLOGÍA

Facultad de Ciencias Marinas
Instituto de Investigaciones Oceanológicas
Facultad de Ciencias
Escuela de Ciencias de la Salud

CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PARTICIPAR EN UN ESTUDIO DE INVESTIGACIÓN

**“EFECTOS ANTIGENOTÓXICOS DE LOS POLISACÁRIDOS SULFATADOS
EL ALGA VERDE *Ulva clathrata* EXPUESTOS A ARSENITO DE SODIO”**

INVESTIGADORES: Dilayaxi Cárdenas Bautista, Dr. Isai Pacheco Ruíz, M.C. Evarista Arellano García, Dra Raquel Muñiz Salazar, M.C. Raúl C. Baptista Rosas.

LUGAR: Ensenada, Baja California

NOMBRE DEL PARTICIPANTE: _____

A usted se le está invitando a participar en este estudio de investigación médica. Antes de decidir si participa o no, debe conocer y comprender cada uno de los siguientes apartados. Este proceso se conoce como consentimiento informado. Siéntase con absoluta libertad para preguntar sobre cualquier aspecto que le ayude a aclarar dudas al respecto.

Una vez que haya comprendido el estudio y si usted desea participar, entonces se le pedirá que firme esta forma de consentimiento, del cual se le entregará una copia firmada y fechada.

JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO

El arsénico es una sustancia química que se encuentra en la tierra, el aire y el agua; principalmente en el agua que se extrae de los pozos profundos. Cuando las concentraciones de arsénico son mayores a las permitidas por la norma de la Organización Mundial de la Salud (OMS) ($50\mu\text{g/L}$), puede inducir a que las células humanas se transformen en células cancerosas. Algunos extractos de algas inhiben el daño inducido por el arsénico y es por eso que se busca que el extracto del alga verde *Ulva clathrata* sirva como terapéutico para contrarrestar el daño provocado por el arsénico.

OBJETIVO DEL ESTUDIO

A usted se le está invitando a participar en un estudio de investigación que tiene como objetivo determinar si los extractos del alga verde *Ulva clathrata* conocidos como polisacáridos inhiben los daños genotóxicos (cáncer) del arsenito de sodio en leucocitos humanos.

DESCRIPCIÓN

A usted se le está invitando a participar en este estudio con la donación de 20 ml de sangre.

A la sangre donada de cada uno de las personas que acepten a participar en esta investigación, se le realizara un estudio genotóxico que consiste en:

Cultivar las células sanguíneas que provengan de personas saludables como usted y a las cuales se le agregaran extractos de el alga conocida con el nombre científico *Ulva clathrata* para probar si estos extractos previenen de sufrir daño cuando se les agrega un agente carcinogénico conocido (arsénico), con el propósito de avanzar en el desarrollo de medicamentos y medidas terapéuticas para enfermos de cáncer.

El estudio experimental se realizara en el Laboratorio de Genotoxicología Ambiental de la Facultad de Ciencias de la UABC.

BENEFICIOS DEL ESTUDIO

Actualmente existen medicamentos como el Fucoidan, el cual es un polisacárido sulfatado que inhibe el crecimiento de células cancerígenas y que se obtiene a partir de las algas pardas. En las algas verdes (ulvales) encontramos el ulvan como polisacárido sulfatado y tiene entre el 5 y 11% de su materia orgánica. Si los polisacáridos sulfatados del alga verde actúan de la misma forma inhibiendo la formación de células cancerígenas, en un futuro otros pacientes pueden beneficiarse con una nueva alternativa de tratamiento a base de algas verdes.

PROCEDIMIENTO DEL ESTUDIO

En caso de aceptar participar en el estudio se le realizaran algunas preguntas personales, hábitos, antecedentes médicos y laborales y datos sobre la salud de familiares más cercanos.

En caso de aceptar, se le tomaran sus signos vitales (presión arterial, frecuencia cardiaca, peso, estatura) y una muestra de 20ml de sangre periférica mediante punción en la vena de su brazo en ayuno, por lo que deberá tomarse la muestra por la mañana y sin haber ingerido ningún alimento.

Esta sangre se utilizará para probar los efectos benéficos del polisacárido sulfatado en un laboratorio especializado, con la técnica de bloqueo de citocinesis y conteo de micronúcleos

RIESGOS ASOCIADOS CON EL ESTUDIO

El estudio consta de 3 fases:

- 1) Historia clínica y la toma de signos, talla y peso.
- 2) Obtención de 20ml de sangre.
- 3) Cultivo de leucocitos a partir de las muestras de sangre y valorar el efecto antigenotóxico de los polisacáridos sulfatados.

La extracción de sangre se hará con una aguja nueva y esterilizada la que se tomara por personal se salud capacitado. El procedimiento es similar al que se

realiza en un laboratorio cuando usted le ordenan unos análisis de sangre; este procedimiento es rutinario no tiene algún tipo de riesgo para la salud. En caso de que usted desarrolle algún efecto adverso secundario o requiera de otro tipo de atención, esta se le brindará en los términos que siempre se han ofrecido.

ACLARACIONES

Su decisión de participar en el estudio es completamente voluntaria.

No habrá ninguna consecuencia desfavorable para usted, en caso de no aceptar la invitación.

Si decide participar en el estudio puede retirarse en el momento que lo desee, aun cuando el investigador responsable no se lo solicite, informando las razones de su decisión, la cual será respetada en su totalidad.

No tendrá que hacer gasto alguno durante el estudio, es decir el estudio es GRATIS.

En el transcurso del estudio usted podrá solicitar información actualizada sobre el mismo, al investigador responsable.

La información obtenida en este estudio, utilizada para la identificación de cada paciente, se mantendrá con estricta confidencialidad por el grupo de investigadores.

Usted también tiene acceso a la Comisión de Investigación y Ética del Hospital Militar Regional El Ciprés, ubicado en Carretera Transpeninsular km 114, Ensenada Baja California, 22780.

Si considera que no hay dudas ni preguntas acerca de su participación, puede, si así lo desea, firmar la Carta de Consentimiento Informado anexa a este documento.

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

Yo, _____ leí y comprendí la información anterior y mis preguntas se respondieron de manera satisfactoria. Se me informo y entendí que los datos se obtengan en el estudio pueden ser publicados o difundidos con fines científicos. Convengo en participar en este estudio de investigación. Recibiré una copia firmada y fechada de esta forma de consentimiento.

Firma del participante o padre o tutor

Fecha

Testigo

Fecha

Testigo

Fecha

Esta parte la llenará el investigador (o su representante):
Le explique al Sr(a)._____ la naturaleza y el propósito de la investigación, así como los riesgos y beneficios que implica su participación. Le conteste las preguntas en la medida de lo posible y le pregunte si tiene alguna duda. Acepto que he leído y conozco la normatividad correspondiente para realizar la investigación con seres humanos y me apegue a ella.

Una vez concluida la sesión de preguntas y respuesta, se procedió a firmar el presente documento.

Firma del investigador

Fecha

EXAMEN MEDICO

1. Ficha de Identificación

Nombre _____ Edad _____ Sexo _____
 Edo. Civil _____ Ocupación _____ Origen _____
 Residencia _____ Fecha _____

2. Antecedentes

2.1 Heredo Familiares: DM _____ HTA _____ Cáncer _____ Tb _____
 Cardiopatías _____ Otras _____

2.2 Personales Patológicos:

Cirugías _____ Traumatismos _____
 _____ Tb _____ Transfusiones _____
 Infectocontagiosos _____

2.3 Personales No Patológicos:

Tabaquismo _____ Alcoholismo _____ Drogadicción _____
 Inmunizaciones _____ Alergias _____ Tipo Sanguíneo _____

3. Padecimiento actual

4. Síntomas Generales

Astenia _____ Adinamia _____ Anorexia _____ Fiebre _____
 Perdida de peso _____ Ansiedad _____

5. Interrogatorio por aparatos y sistemas

5.1 Aparato Digestivo _____
 5.2 Aparato Cardiovascular _____
 5.3 Aparato Respiratorio _____
 5.4 Aparato genitourinario _____
 5.5 Sistema Endocrino _____
 5.6 Sistema Nervioso _____
 5.7 Sistema Osteomuscular _____
 5.8 Órganos sensoriales _____
 5.9 Psicosomático _____

6. Diagnósticos anteriores:

7. Terapéutica anterior o actual:

8. Signos Vitales:

F.C. _____ F.R. _____ T.A. _____ Temp. _____ Peso _____ Talla _____

9. Exploración General

10. Exploración regional

Cabeza _____

Cuello _____

Torax _____

_____ Abdomen _____

MsSs y MsIs _____

Genitales _____

11. Diagnóstico medico

12. Tratamiento

Nombre y Firma del Medico
