

Trabajos Originales

Compuestos fenólicos de la fracción metanólica de *Bidens pilosa*, sobre la neoplasia gástrica, inducida en ratas

Jorge Arroyo ¹, Pablo Bonilla ⁵, Ernesto Ráez ³, Silvia Suárez ⁴, Robert Palomino ², Segundo Terán ², Aníbal Villarreal ², Manuel Marin ⁶, Julio Chenguayén ⁷, Hugo Justil ⁷

Resumen

Objetivo: Determinar la influencia del extracto etanólico y la fracción metanólica conteniendo compuestos fenólicos y flavonoides de la planta entera de *Bidens pilosa* L sobre la neoplasia gástrica inducida en ratas con N-nitroso-N-metilurea (NMU). **Diseño:** Experimental. **Lugar:** Instituto de Investigaciones Clínicas-Bioterio Facultad de Medicina UNMSM. **Material biológico:** Ratas albinas cepa Holtzmann machos. **Intervenciones:** Según Ferraz de Souza y col., 2002, se dispuso de un grupo control normal, un grupo con NMU y grupos de NMU más tratamientos de extracto etanólico y fracción metanólica, a dosis de 300 mg/kg. Para la significancia estadística se consideró la $p < 0,05$. **Principales medidas de resultados:** Progresión de la neoplasia gástrica inducida en ratas. **Resultados:** Indican displasia y estadios iniciales de carcinoma en los estómagos de las ratas, lo que fue menos evidente en los animales con tratamiento, siendo mejor el grupo que recibió fracción metanólica. El marcador de estrés oxidativo disminuyó en los grupos que recibieron tratamiento con la planta, resultando mejor la fracción metabólica. Se observó menor cantidad de micronúcleos (genotoxicidad) en los animales que recibieron tratamiento. **Conclusiones:** El extracto etanólico y la fracción metanólica de *Bidens pilosa* L en las condiciones experimentales han detenido la progresión de la neoplasia gástrica inducida en ratas.

Palabras clave

Neoplasmas gástricos; investigación; fenoles; bioflavonoides; extractos vegetales.

Phenolic compounds from *Bidens pilosa* methanolic fraction on induced gastric neoplasia in rats

Abstract

Objective: To determine the influence of both the ethanolic extract and the methanolic fraction containing phenolic and flavonoids compounds of *Bidens pilosa* L whole plant on gastric cancer induced in rats with N-nitroso-N-methylurea (NMU). **Design:**

Experimental. Setting: Instituto de Investigaciones Clínicas-Bioterio, Facultad de Medicina UNMSM. **Biologic material:** Holtzmann male albino rats. **Interventions:** Following Ferraz de Souza et al., 2002, we had a normal control group, a group with NMU and NMU groups plus treatments with ethanolic extract and methanolic fraction at 300 mg/kg doses. For statistical significance we considered $p < 0,05$. **Main outcome measures:** Progresion of gastric neoplasia induced in rats. **Results:** Indicate dysplasia and initial stages of carcinoma in the rats stomachs, which was less evident in the animals with treatment, being better the group that received the methanolic fraction. The marker of oxidative stress decreased in the groups that received treatment with the plant, being better the methanolic fraction. We observed less amount of micronuclei (genotoxicity) in the animals that received treatment. **Conclusions:** In experimental conditions the ethanolic extract and methanolic fraction delayed the advance of gastric cancer induced in rats.

Key words: Stomach neoplasms; research; phenols; bioflavonoids; plant extracts.

¹ Instituto de Investigaciones Clínicas. Facultad de Medicina, UNMSM. Lima, Perú.

² Sección de Farmacología. Facultad de Medicina, UNMSM. Lima, Perú.

³ Instituto de Patología. Facultad de Medicina, UNMSM. Lima, Perú.

⁴ Centro de Investigación de Bioquímica y Nutrición. Facultad de Medicina, UNMSM. Lima, Perú.

⁵ Instituto de Ciencias Farmacéuticas y Recursos Naturales. Facultad de Farmacia y Bioquímica, UNMSM. Lima, Perú.

⁶ Instituto de Ciencias Biológicas Antonio Raymondi. Facultad de Ciencias Biológicas, UNMSM. Lima, Perú.

⁷ Egresados de la Maestría de Farmacología. Facultad de Farmacia y Bioquímica, UNMSM. Lima, Perú.

INTRODUCCIÓN

Los grupos hidroxilo y fenólicos están contenidos en la estructura química de los flavonoides, los cuales le confieren excelentes propiedades de quelación del hierro y otros metales de transición y por lo tanto tienen una gran capacidad antioxidante ⁽¹⁾. Por lo expuesto, desempeñan un papel esencial en la protección frente a los fenómenos de daño oxidativo y tienen efectos terapéuticos en un elevado número de patologías, incluyendo la cardiopatía isquémica, la aterosclerosis o el cáncer ⁽²⁾. Los vegetales contienen compuestos fenólicos y flavónicos, los cuales son pigmentos naturales y que protegen al organismo humano del daño producido por agentes oxidantes; están ampliamente distribuidos en plantas, frutas, verduras y representan componentes sustanciales de la parte no energética de la dieta humana ⁽³⁾. Su estructura química les permite ser atrapadores de radicales libres, siendo excelentes antioxidantes ⁽¹⁾; protegen así del daño oxidativo y patologías, como el cáncer ⁽²⁾.

Los estudios fitoquímicos del extracto etanólico total y de las fracciones de dicho extracto de la planta total de *Bidens pilosa* L indicaron la presencia de chalconas, glucósidos del ácido fenilpropanoico, poliacetilenos, un diterpeno, flavonoides, glucósidos de flavona, compuestos fenólicos ⁽⁴⁾. Los estudios farmacológicos previos a esta investigación mostraron que *Bidens pilosa* L posee actividad antihipertensora ⁽⁵⁾, antiulcerosa ⁽⁶⁾, hepatoprotectora ⁽⁷⁾, inmunosupresora-antiinflamatoria ⁽⁸⁾, anti-leucémica ⁽⁹⁾ y antimicrobiana ⁽¹⁰⁾.

Por lo expuesto, la presente investigación tuvo por objetivo identificar y aislar la fracción que contiene compuestos fenólicos y flavonoides de la planta entera de *Bidens pilosa* L, para luego determinar su eficacia quimioprotectora sobre la neoplasia gástrica inducida en ratas con NMU, estableciendo su influencia sobre la activi-

dad antigenotóxica y sobre un marcador de estrés oxidativo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se usó ratas albinas de cepa Holtzman, con peso al inicio de la investigación de 100 a 130 g, de 2 meses de edad, machos, procedentes del Bioterio del Instituto Nacional de Salud (INS), del Ministerio de Salud, mantenidas en jaulas metálicas de 85X30X20 centímetros, con aserrín del INS, el que era cambiado dos veces a la semana, con un ambiente a temperatura de 21 °C, con dieta para rata del INS y agua a libertad.

La planta *Bidens pilosa* L. (amor seco), fue recolectada en el caserío de San José Bajo, distrito de Santiago de Cao, provincia de Ascope, departamento de la Libertad, Perú.

Como inductor de cáncer gástrico se utilizó N-nitroso-N-metilurea (NMU) de Sigma.

Como solventes, se utilizó alcohol 96° (etanol), metanol ACS (Fisher), N-hexano PA (Merck), cloroformo ACS-HPLC (Fisher). Como reactivos, se utilizó *Silicagel* granulado (60-200 mesh) JT Baker, para cromatografía en columna rápida, hidróxido de sodio (Merck), EDTA (Merck), formol 40% (Laboratorio Portugal), heparina sódica (Laboratorios Trifarma), colorante Giemsa (Merck), colorante Wright (Sigma), aceite de inmersión (Merck).

La obtención de la fracción que contiene compuestos fenólicos y flavonoides de la planta entera de *Bidens pilosa* L, fue mediante los siguientes procesos: Ubicación y recolección de la muestra vegetal; clasificación taxonómica realizada en el Museo de Historia Natural 'Javier Prado', de la UNMSM, y estudio botánico según la bibliografía especializada ⁽¹¹⁾; molienda y almacenamiento; se preparó el extracto

etanólico mediante maceración en etanol de 96°, a temperatura ambiente, protegido de la luz durante 8 días con agitación periódica (12,13); preparación de extracto etanólico, siguiendo parámetros establecidos (12,13). En el extracto etanólico seco se realizó una marcha fitoquímica (13), se procedió a hacer las reacciones de identificación o coloración para cada tipo de metabolito secundario presente, con los reactivos específicos; en los resultados se indicó la presencia o ausencia del metabolito: 5 mg de extracto problema con 5 gotas de reactivos. Luego, se procedió a la obtención de fracciones del extracto etanólico total, mediante cromatografía en columna rápida, para lo cual se utilizó solventes de polaridad creciente: n-hexano, cloroformo, metanol y agua destilada, para separar metabolitos afines y poder relacionar estructura química con actividad farmacológica del extracto etanólico total y de la fracción metanólica. A los cuatro subextractos también se les hizo una marcha fitoquímica. Tabla 1.

La inducción de la neoplasia gástrica (14) consistió en formar 4 grupos de 6 ratas cada uno; el primero recibió suero fisiológico 5 mL/kg (control negativo), a los grupos segundo, tercero y cuarto (controles positivos), se les administró 0,5 mL de solución conteniendo 50 ug de N-nitroso-N-metilurea (NMU), diariamente, por vía oral (VO). Por igual vía de administración, el tercer y cuar-

to grupos además recibieron extracto alcohólico y fracción metanólica, respectivamente, en dosis de 300 mg/kg VO. Luego de 16 semanas, los animales fueron anestesiados con pentobarbital 30 mg/kg, permitiendo obtener sangre por punción cardiaca, para estudios de antigenotoxicidad y determinación del marcador de estrés oxidativo. Después, los animales fueron sacrificados por sobredosis de pentobarbital (100 mg/kg), seguidamente se retiró los estómagos, para su evaluación macro y microscópica; el estómago fue conservado en formol al 10%, para efectuar el estudio histopatológico, el que se realizó mediante la coloración hematoxilina-eosina; se observó el tipo y forma de células tumorales presentes en el campo de observación.

La actividad antigenotóxica se realizó por medio de la prueba de micronúcleos (15), donde se buscó la disminución del daño cromosómico y la frecuencia de eritrocitos policromáticos presentes en la sangre de los animales de experimentación con inducción de cáncer gástrico. La evaluación consistió en toma de muestras de sangre periférica, para realizar frotices y tinción con las soluciones de Giemsa 0,6% y Wright al 1% (v/v). Se contabilizó 1 400 eritrocitos policromáticos, en promedio, por animal y tratamiento. Se identificó los micronúcleos de acuerdo con el criterio establecido por la bibliografía especializada (16). El efecto

Tabla 1. Estudio fitoquímico de *Bidens pilosa* L.

Reacción de	Metabolitos secundarios	Extracto etanólico	Fracción metanol	Fracción cloroformo	Fracción N-hexano	Fracción acuosa
Dragendorf	Alcaloides	-	-	-	-	-
Shinoda	Flavonoides	++	++	+	-	-
Espuma	Saponinas	-	-	-	-	-
Tricloruro férrico	Compuestos fenólicos	++	+++	+	+	+
Gelatina	Taninos	++	++	+	-	-
Lieberman-Burchard	Esteroides y/o terpenoides	-	-	-	-	-
Ninhidrina	Aminoácidos libres	-	-	-	-	-
Molish (alfa naftol)	Glicósidos	++	++	-	-	-

Ausencia (-) Poco (+) Regular (++) Abundante (+++)

antigenotóxico fue determinado por la frecuencia de eritrocitos policromáticos micronucleados presentes, debido a la presencia del tóxico inductor del cáncer.

El marcador de estrés oxidativo (^{17,18}) fue determinado en suero procedente de la sangre extraída de las ratas sometidas a inducción de neoplasia gástrica. Se empleó la prueba de especies reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS), que en forma general mide la formación de malondialdehído u otros carbonilos procedentes de la conversión oxidativa de lípidos y otras moléculas como proteínas.

Los resultados fueron informados como formación del complejo malondialdehído-ácido tiobarbitúrico (MDA-TBA), complejo coloreado que se mide a 535 nm. Se usó el coeficiente de extinción molar de MDA-TBA: $1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

La eficacia quimioprotectora fue analizada mediante la prueba del chi cuadrado, la prueba de probabilidad exacta de Fisher, análisis de varianza con múltiples comparaciones de Duncan; los resultados fueron expresados por medias \pm error estándar. Los datos de micronúcleos, nivel de radicales libres, fueron evaluados por el análisis de varianza y la media de grupos com-

paradas con la prueba de LSD (diferencia significativa mínima); para los diferentes análisis se consideró una $p < 0,05$

RESULTADOS

Se obtuvo un extracto etanólico total con aspecto de masa homogénea, consistencia blanda, color verde petróleo, libre de partículas extrañas; el rendimiento fue de 9,4% de planta entera.

El estudio fitoquímico mostró que los flavonoides, compuestos fenólicos y taninos estuvieron en mayor cantidad en la fracción metanólica (Tabla 1).

Con relación a la eficacia quimioprotectora de la fracción rica en compuestos fenólicos de la planta entera de *Bidens pilosa* L, la Tabla 2 se aprecia la respuesta sobre la displasia gástrica por efecto del extracto etanólico y fracción metanólica de *Bidens pilosa*, observándose un mejor efecto con la fracción metanólica.

En la Figura 1 se observa displasia y discariosis a nivel gástrico, inducidas en ratas por NMU. Y las Figuras 2 y 3 muestran las respuestas favorables del extracto etanólico y la fracción metanólica de *Bidens*

Tabla 2. Observaciones histopatológicas agrupadas según tratamientos, en la inducción de neoplasia gástrica en ratas.

Tratamiento	Observaciones
Control (-) normal	Descamación superficial propia de la función gástrica y posiblemente por la introducción de la sonda diariamente.
Control (+) tóxico inductor (TI)	Se observa displasia caracterizada por el aumento del tamaño de los núcleos de células basales, que se van haciendo picnóticas hacia la superficie. Asimismo, desorganización, como inicio de una lesión precancerosa.
TI + extracto etanólico de <i>Bidens pilosa</i> L	Mucosa gástrica que cumple con su función de digestión, mostrando gran secreción mucosa. No llega a producir inflamación ni cambios precancerosos.
TI + fracción metanólica de <i>Bidens pilosa</i> L	Mayor defensa, porque se observa empastamiento de células glandulares apicales y secreción mucosa. Esto significa que la fracción ha protegido más al estimular a las células a que se defendieran de la injuria, haciendo que las células superficiales variaran hacia una metaplasia.

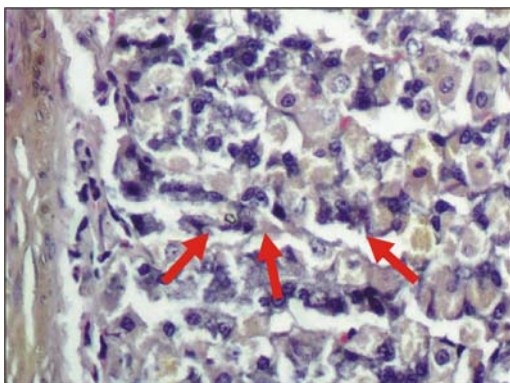


Figura 1. Displasia (picnosis en los núcleos de la base que paulatinamente abarca todas las glandulas). Descamación superficial; discariosis, núcleos hiperpigmentados, anisonucleosis y poiquilonucleosis. 400X.

pilosa sobre la neoplasia gástrica, demostrando mejor efecto el extracto metanólico.

En la Figura 4 se aprecia un gráfico de barras con las características histopatológicas, observándose una mayor alteración en el grupo tratado con NMU, mientras los grupos tratados con extracto etanólico y fracción metanólica hubo una disminución, destacando el grupo que recibió fracción metanólica.

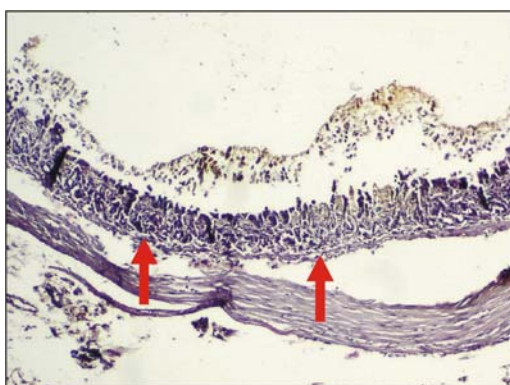


Figura 2. Efecto del extracto etanólico de *Bidens pilosa* L. Atrofia con secreción mucosa y detritus, disminución del epitelio glandular. 100X.

Respecto al ensayo de antigenotoxicidad, en la Tabla 3 se observa la presencia de eritrocitos policromáticos, en mayor cantidad en las ratas que recibieron tóxico inductor solamente, mientras que en aquellas que recibieron tóxico inductor más extracto etanólico y fracción metanólica mostraron disminución de eritrocitos policromáticos, siendo mejor en aquellas que recibieron fracción metanólica. Así mismo, se observó un aumento apreciable en la frecuencia de eritrocitos policromáticos micronucleados en aquellos que recibieron el tóxico inductor y fracción etanólica, comparados con el control y la fracción metanólica.

La Figura 5 muestra el efecto del extracto etanólico y fracción metanólica sobre el estrés oxidativo, observándose un mejor efecto de la fracción metanólica en ratas con cáncer gástrico, mientras que el grupo que recibió solamente NMU mostró un mayor nivel de estrés oxidativo.

DISCUSIÓN

Se ha demostrado que el extracto etanólico y la fracción metanólica de *Bidens*

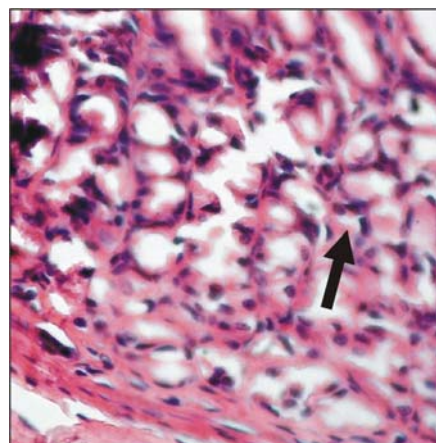


Figura 3. Efecto de la fracción metanólica de *Bidens pilosa* L sobre la neoplasia gástrica. Detalle glandular con discreta erosión. 400X.

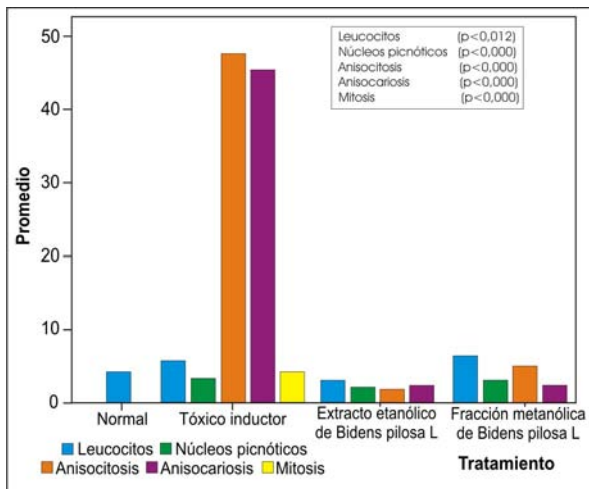


Figura 4. Características histopatológicas en la inducción de neoplasia gástrica en ratas. Se observa más alteraciones en los animales que solo recibieron N-nitroso-N-metilurea (NMU).

pilosa L han detenido la progresión de la neoplasia gástrica inducida en ratas por el N-nitroso-N-metilurea (NMU).

La palabra neoplasia suele ser usada genéricamente como sinónimo de tumor, pero solo en el sentido de cualquier proceso que

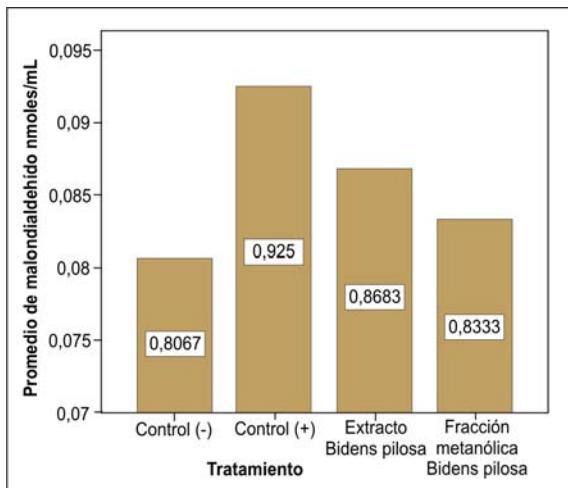


Figura 5. Marcador de estrés oxidativo en suero de ratas con inducción de neoplasia gástrica.

implique proliferación celular excesiva debido a diversos factores, como defecto genético, ambientales, tipos y estilos de vida, factores químicos, físicos y los de tipo biológico (19). Particularmente en esta investigación, se indujo la neoplasia por exposición al N-nitroso-N-metilurea (NMU).

El N-nitroso-N-metilurea (NMU) es un agente inductor de tumores; tiene alta afinidad por los receptores H₂ y mucho menos por lo H₁. Como es conocido, los H₁ y H₂ muestran un enlace a diferentes sistemas de segundos mensajeros, que le confieren a las células características de alta capacidad proliferativa, tales como entidades indiferenciadas y células transformadas (20). La explicación molecular del NMU para inducir tumoración se explicaría vía los productos de la hidrólisis del inositol fosfato mediado por la fosfolipasa C, para permitir la movilización subsecuente de Ca²⁺ y la activación de proteína quinasa C, lo que es una señal reguladora del crecimiento importante (21). Existen muchas comunicaciones sobre la interacción del NMU sobre el receptor H₂ y la inducción del cáncer de mama en ratas (22). Aunque la inducción del cáncer gástrico no es clara, se podría explicar que el NMU a nivel glandular del estómago de ratas interactuarían por los receptores H₂ de las células parietales, para inducir la proliferación celular incontrolada. En el presente estudio, al inducir cáncer gástrico, se logró observar una desorganización, por inicio de una lesión precancerosa en el grupo de animales que solo recibieron el tóxico.

En el presente estudio, al administrar 50 ug de NMU vía oral diariamente, por cuatro meses, el grupo control llegó solo a displasia, atrofia, necrosis e inflamación crónica (habiéndose logrado observar una desorganización por inicio de una lesión precancerosa en el grupo de animales que solo recibieron el tóxico), en similitud a lo informado por Watanabe y col, 1994 (23), quienes al dar de beber a libertad solución de agua conteniendo

Tabla 3. Ensayo de antigenotoxicidad mediante búsqueda de micronúcleos en sangre de ratas con inducción de cáncer gástrico

Tratamiento	PCE	mPCE	% dism. mPCE
Control (-) normal	1293,35	0,25	0
Control (+) tóxico inductor (TI)	2680,04	3,86	100
TI + extracto etanólico de <i>Bidens pilosa</i> L	1577,22	3,39	12,2
TI + fracción metanólica de <i>Bidens pilosa</i> L	1501,67	1,87	51,6

PCE = Eritrocitos policromáticos normales; mPCE = eritrocitos policromados micronucleados.

do 100 ug/mL de NMU a ratas durante cuatro meses, menciona haber encontrado solamente casos de inflamación y atrofia crónicas. Los animales que recibieron dosis única de 300 mg/kg de la fracción metanólica de la planta entera de *Bidens pilosa* L mostraron al estudio histopatológico mejor defensa, porque se observó empastamiento de células glandulares apicales y secreción mucosa, en grado mayor que los animales que recibieron extracto etanólico de la planta (Tabla 2, Figura 1, 2, 3 y 4), posiblemente porque la fracción ha protegido más al estimular a las células a que se defendieran de la injuria por el NMU, haciendo que las células superficiales variaran hacia una metaplasia, debido probablemente a su alto contenido de compuestos fenólicos, como flavonoides, glicósidos flavónicos y taninos (12,13) (Tabla 1).

Las especies reactivas del oxígeno (ROS), por ejemplo aniones del superóxido, el peróxido de hidrógeno y el oxidrilo, el óxido nítrico y radicales del peroxinitrito, desempeñan un papel importante en el estrés oxidativo relacionado con la patogenia de varias enfermedades importantes. En individuos sanos, la producción de radicales libres es balanceada por el sistema antioxidante de la defensa. Sin embargo, se genera el estrés oxidativo cuando el equilibrio favorece la generación del radical libre como resultado de un agotamiento de niveles antioxidantes. El daño oxidativo causado por la acción de radicales libres, puede iniciar y promover la progresión de

un número de enfermedades crónicas, tales como cáncer, enfermedades cardiovasculares, desórdenes neurodegenerativos y envejecimiento (22,24). En la Figura 5, se observa que los tratamientos administrados en la inducción de cáncer gástrico muestran una menor cantidad de moléculas del complejo coloreado malondialdehído-ácido tiobarbitúrico, lo que estaría indicando una disminución de radicales libres y posiblemente un menor daño de la membrana celular (o menor lipoperoxidación de la membrana celular).

La actividad quimioprotectora del cáncer por los flavonoides puede ser explicada porque induce apoptosis al activar la caspasa 8 y Bax, inhibir la expresión del Bcl-2 y liberar citocromo C (25); también, por su actividad antioxidante y antiangiogénica, al suprimir la proliferación del factor de crecimiento vascular (VEGF) (26). Por otro lado, existe información científica que estos podrían inducir riesgos de mutagenotoxicidad (27). Pero, según la Tabla 3, se muestra que la influencia de la fracción metanólica de *Bidens pilosa* L ha reducido la frecuencia de micronúcleos, que se relaciona con la genotoxicidad y el desarrollo de procesos carcinogénicos (28).

Se recomienda realizar estudios con mayor tiempo de exposición al tóxico inductor a fin de observar el desarrollo de cáncer gástrico. La presente investigación es un proceso inicial en la búsqueda de una sustancia de origen natural que contribuya en el tratamiento coadyuvante del cáncer gástrico.

AGRADECIMIENTOS

Se da un agradecimiento muy especial al Consejo Superior de Investigaciones de la UNMSM, por el financiamiento del Proyecto FEDU de código 050103051 del año 2005.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Haysteen B. Flavonoids. A class of natural products of high pharmacological potency. *Biochem Pharmacol.* 1983;32:1141-8.
2. Pace-Asciak C, Hahn S, Diamandis E, Soleas G, Goldberg DM. The red wine phenolics trans-resveratrol and quercetin block human platelet aggregation in eicosanoid synthesis: implication for protection against coronary heart disease. *Clin Chim Acta.* 1995;235:207-19.
3. Aherne S, O'Brien N. Dietary flavonols: chemistry, food content, and metabolism. *Nutrition.* 2002;18:75-81.
4. Jemal A, Murray T, Ward E, Samuels A, Tiwari RC, Ghafoor A, et al. Cancer statistics. *CA Cancer J Clin.* 2005;55:10-30.
5. Dimo T, Rakotonirina S, Tan P, Azay J, Dongo E, Cros G. Leaf methanol extract of *Bidens pilosa* prevents and attenuates the hypertension induced by high-fructose diet in Wistar rats. *Journal of Ethnopharmacology.* 2002;83:183-91.
6. Tan P, Dimo T, Dongo E. Effects of methanol, cyclohexane and methylene chloride extracts of *Bidens pilosa* on various gastric ulcer models in rats. *Journal of Ethnopharmacology.* 2000;73:415-21.
7. Chin H, Lin C, Tang K. The hepatoprotective effects of Taiwan folk medicine ham-hong-chho in rats. *American Journal of Chinese Medicine.* 1996;24:231-40.
8. Jager AK, Hutchings A, van Staden J. Screening of Zulu medicinal plants for prostaglandin-synthesis inhibitors. *Journal of Ethnopharmacology.* 1996;52:95-100.
9. Chang J, Chiang L, Chen C, Liu L, Wang K, Lin C. Antileukemic activity of *Bidens pilosa* L. var. *minor* (Blume) Sherff and *Houttuynia cordata* Thunb. *American Journal of Chinese Medicine.* 2001;29:303-12.
10. Rabe T, van Staden J. Antibacterial activity of South African plants used for medicinal purposes. *Journal of Ethnopharm.* 1997;56:81-7.
11. D'ambrogio de Argüeso A. *Técnicas en Histología Vegetal.* 1ra ed. Buenos Aires: Editorial Hemisferio Sur; 1986. p. 15-6.
12. Domínguez X. *Métodos de Investigación Fotoquímica.* México, DF: Ed. Limusa; 1985.
13. Lock de Ugaz O. *Investigación fitoquímica, métodos en el estudio de productos naturales.* 2da edición. Lima: Fondo Editorial Pontificia Universidad Católica; 1994.
14. Ferraz de Souza I, Lázaro da Silva A, Misumi A, Savi D, Santos D, Fernandes F, et al. Estudo histológico e computadorizado das áreas com células parietais e principais no estômago de ratos wistar tratados com pantoprazol e «N-nitroso-N-methyurea (NMU). *Acta Cir Bras.* 2002;17(4):251-7.
15. Schmidt W. The micronucleus test. *Mutat Res.* 1975;9:31-9.
16. Rietjens I, Boersma M, Van der Woude H, Jeurissen S, Schutte M, Alink G. Flavonoids and alkenylbenzenes: mechanisms of mutagenic action and carcinogenic risk. *Mutation Research.* 2005;574:124-38.
17. Buege J, Aust S. Microsomal lipid peroxidation. *Methods in Enzymology.* 1978;52:302-10.
18. Suárez S. Detoxificación hepática y defensa antioxidante por efecto de xenobióticos alimentarios. Tesis para optar al Grado Académico de Magister en Bioquímica. Lima: Facultad de Medicina, UNMSM; 1995.
19. Robbins S, Cotran R, Kumar V. *Patología Estructural y Funcional.* 6ta Ed. México, DF: Ed. McGraw-Hill Interamericana; 2000. p. 1208-28.
20. Davio C, Cricco G, Bergoc R, Rivera E. H1 y H2 histamine receptor in N-nitroso-N-methylurea (NMU) induced carcinomas with atypical coupling to signal transducers. *Biochemical Pharmacology.* 1995;50(1):91-6.
21. Moolenaar WH. G-Protein-coupled receptors, phosphoinositide hydrolysis and cell proliferation. *Cell Growth Differ.* 1991;2:359-64.
22. Rivera E, Martin G, Melito G, Davio C, Cricco G, Mohamad N, et al. Histopathology and influence of the estral cycle on NMU induced tumors. *Cancer Lett.* 1994;86:222-8.
23. Watanabe H, Ando Y, Yamada K, Okamoto T, Ito A. Lack of any positive effect of intestinal metaplasia on induction of gastric tumors in Wistar rats treated with N-methyl-N-nitrosourea in their drinking water. *Jpn J Cancer Res.* 1994;85:892-96.
24. Finkel T, Holbrook N. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature.* 2000;408:239-47.
25. Hyon-Seok J, Sung-Ho K, Young-Ok S, Jong-Ghee K, Young-Mi J, Yong-Suk J, et al. Flavonoids purified from *Rhus verniciflua* Stokes actively inhibit cell growth and induce apoptosis in human osteosarcoma cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA).* 2005;1726:309-16.
26. Deog K, Liping L, Weimin G, Mohsen M. Chemical structure of flavonols in relation to modulation of angiogenesis and immune-endothelial cell adhesion. *Journal of Nutritional Biochemistry.* 2005;17:165-76.
27. The Collaborative Study Group for the Micronucleus test (CSGMT) (CSGMT/JEMS.MMS; The Mammalian Mutagenesis Study Group of the Environmental Mutagen Society of Japan). Protocol recommended by the CSGMT/JEMS.MMS for the short-term mouse peripheral blood micronucleus test. *Mutagenesis.* 1995;10(3):153-9.
28. Heddle JA, Salamone MF, Hite M, Kirkhart B, Mavournin K, MacGregor JG, et al. The induction of micronuclei as a measure of genotoxicity. *Mutation Research.* 1983;123:61-118.

Manuscrito recibido el 16 de junio de 2007 y aceptado para publicación el 20 de agosto de 2007.

Correspondencia:

Jorge Luis Arroyo Acevedo

Facultad de Medicina, UNMSM.

Av. Grau 750. Lima 1, Perú.

Correo-e: jorgeluis_arroyoacevedo@yahoo.es