

EFECTO DEL EXTRACTO BUTANÓLICO DE *PEPEROMIA DOLABRIFORMIS* SOBRE EL ADN DE LINFOCITOS HUMANOS EVALUADOS POR EL ENSAYO COMETA

Blgo. Deyvi Edwar Meléndez-Rodríguez

Departamento Académico de Ciencias Biológicas. Universidad Nacional de Trujillo, Trujillo, Perú

Dra. Gina Genara Zavaleta-Espejo

Docente de la Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Nacional de Trujillo, Trujillo, Perú
Laboratorio de Bionanotecnología y Reproducción Animal. Departamento de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional de Trujillo, Trujillo, Perú

Dr. Willian Genaro Blas-Cerdán

Docente de la Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Nacional de Trujillo, Trujillo, Perú
Director de la Segunda Especialidad. Universidad Nacional de Trujillo, Trujillo, Perú

Dr. José Antonio Saldaña-Jiménez

Docente de la Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Nacional de Trujillo, Trujillo, Perú
Laboratorio de Bionanotecnología y Reproducción Animal. Departamento de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional de Trujillo, Trujillo, Perú

Autor corresponsal

Dra. Gina Genara Zavaleta-Espejo

Av. Juan Pablo II s/n. Ciudad Universitaria. Trujillo, La Libertad-Perú

email.com: gzavaleta@unitru.edu.pe

Recibido: 09/03/2023

Aceptado: 04/05/2023

RESUMEN

Para evaluar el daño genotóxico del extracto butanólico de *Peperomia dolabriformis*, se utilizaron linfocitos de sangre periférica humana, los que se cultivaron en el medio "PB-max karyotyping medium" durante 24 horas a 37 °C. Se usó buffer fosfato y peróxido de hidrógeno como controles negativo y positivo. Los grupos experimentales fueron T1, T2 y T3 con extracto butanólico a las concentraciones de 0,00125%, 0,0025% y 0,01% respectivamente. Los linfocitos embebidos en agarosa LMP a 37 °C fueron lisados y sometidos a electroforesis alcalina a 300 mA, 20 V por 40 minutos. Las láminas se colorearon con naranja de acridina, se observaron en microscopio de fluorescencia y se analizaron con el programa "Comet Score". El mayor daño genotóxico al ADN se presentó en la concentración 0,01% con un 65,06% de "DNA in Tail" y 26,49% en el "Tail Moment".

Palabras clave: Extracto butanólico, ensayo cometa, genotoxicidad, linfocitos, *Peperomia dolabriformis*

EFFECT OF THE BUTANOLIC EXTRACT OF *PEPEROMIA DOLABRIFORMIS* ON THE DNA OF HUMAN LYMPHOCYTES EVALUATED BY THE COMET ASSAY

ABSTRACT

The purpose of this research was to evaluate the effect of butanolic extract from *Peperomia dolabriformis* on the DNA from human lymphocytes. The DNA damage comet assay was evaluated in human peripheral blood lymphocytes that were cultured in PB-max karyotyping medium and incubated during 24 hours at 37 °C. Phosphate buffer and 100 uM-hydrogen peroxide were the negative and positive controls. Treatment groups contained 0.00125%, 0.0025% and 0.01% butanolic extract,

respectively. Lymphocytes embedded in 37 °C-LMP agarose were lysed and subjected to electrophoresis under alkaline conditions at 300 mA, 20 V for 40 minutes. Acridine orange stained slides were examined using a fluorescent microscope, and the DNA damage was analyzed by the comet score software. The 0.01%-butanolic extract damaged the DNA with 65.06% in the Tail of the comet and 26.49 in the Tail Moment.

Keywords: Butanolic extract, comet assay, genotoxic, lymphocytes, *Peperomia dolabriformis*

INTRODUCCIÓN

Peperomia sp. pertenece a la familia Piperaceae, es un género que cuenta con 1.770 especies, descritas por H. Dahlstedt en el año de 1900. En el Perú se reportan más de 400 especies (1,2). *Peperomia dolabriformis* Kunth, es una hierba suculenta nativa de la región norte del Perú, distribuida en los departamentos de La Libertad, Cajamarca, Lambayeque y Amazonas entre los 100 y 1.900 m.s.n.m.; además, presenta variedades como *velutina*, *grandis*, *confertifolia*, *brachyphylla* y *dolabriformis* (3,4). Algunas especies de *Peperomia* son usadas en la medicina ancestral contra diversas enfermedades y dolencias, por ello han sido objeto de estudio en diversas investigaciones, evaluando la capacidad biológica de sus metabolitos y el potencial tóxico de sus extractos (5). Para evaluar el efecto citotóxico y genotóxico de los fitoconstituyentes de extractos acuosos, alcohólicos, clorofórmicos y otros productos químicos existen numerosas técnicas, como el Test *Allium*, ensayo introducido en los años 30 del siglo pasado, cuya finalidad es evaluar el efecto genotóxico basado en estudios cromosómicos en meristemos radiculares de *Allium cepa* (6); el test de micronúcleos, permite evaluar la inestabilidad genética como un indicador indirecto de rotura cromosómica, validada a nivel mundial y considerado como un biomarcador efectivo de daño en el ADN (7) y el ensayo cometa, que permite evaluar el daño en la molécula del ADN producido por agentes genotóxicos (8).

El ensayo cometa es una técnica sencilla y económica, descrita para detectar daño a nivel de ADN en células embebidas en agarosa, las células son lisadas con detergentes y colocadas a un campo eléctrico, dando como resultado la migración de las moléculas cargadas negativamente desde el núcleo hacia el ánodo (8). El mecanismo de la formación de los cometas en los últimos 30 años no se ha dilucidado completamente, pero las conclusiones de algunos autores indican que la migración se debe a la alcalinidad o neutralidad del buffer de electroforesis y al agente genotóxico (9,10).

El ensayo cometa es aplicable a las células cultivadas de mamíferos, células mononucleares de sangre periférica (PBMN), tejidos desglosados, hemolinfa de moluscos, levaduras y los núcleos aislados a partir de tejidos de las plantas (11). Es común para criopreservar células en los estudios de biomonitorio (12); esta técnica no solo mide daño genético sino también la reparación celular de los

linfocitos humanos (13), cuya importancia radica en detectar daño a nivel de ADN producido por diversas sustancias tanto químicas como biológicas (14).

Por los motivos antes descritos, la presente investigación tiene como objetivo evidenciar el efecto del extracto butanólico de *P. dolabriformis* sobre el ADN de linfocitos humanos, estudiados *in vitro* mediante el ensayo de electroforesis alcalina de células individuales.

MÉTODOS

Material biológico

Linfocitos humanos obtenidos de sangre periférica procedentes de hombres entre las edades de 20-25 años y *Peperomia dolabriformis* "congona de zorro".

Recolección de la planta *Peperomia dolabriformis* "congona de zorro"

Las plantas fueron recolectadas de las lomas costeras del cerro Campana, a una altitud entre los 200 a 400 m.s.n.m. del distrito de Huanchaco, provincia de Trujillo, región de La Libertad, Perú y fueron identificadas en el Herbarium Truxillense (HUT) de la Universidad Nacional de Trujillo.

Preparación del extracto butanólico de *Peperomia dolabriformis* "congona de zorro"

Se procedió a lavar las cortezas, hojas, raíces y flores de las plantas con agua destilada para eliminar partículas contaminantes, se dejó secar a temperatura ambiente por 24 horas a 22 °C. Luego se procedió a secar completamente, en una estufa a una temperatura de 50 °C por 14 días; se pulverizó en un molino, hasta obtener un polvo fino. La extracción alcohólica, se obtuvo con el equipo Soxhlet con el solvente butanol puro, diluido al 70% con agua Milli Q tipo 1. Por cada 100 g de muestra pulverizada se colocó 1 litro de solvente (alcohol butanol al 70 %) (15). Se filtró con un sistema al vacío, con ayuda del kitasato y el embudo de buchner, con un filtro de poro de 0,45 µm. El disolvente se evaporó en una cabina extractora de gases y se conservó a 4 °C en una placa de Petri.

Preparación del medio de cultivo para linfocitos humanos obtenidos de sangre periférica

Los linfocitos se obtuvieron de sangre periférica mediante punción venosa, utilizando tubos de 10 mL con heparina

sódica de tres donantes masculinos no fumadores entre 20 a 25 años de edad; se centrifugó a 1.000 rpm por 10 minutos hasta obtener tres capas. La primera capa que contenía el plasma se eliminó, en la capa media se encontraron los linfocitos, los que se colocaron en matraces de cultivo de la marca CORNING con filtro, que tuvieron 5 mL de medio PB-MAX™ Karyotyping Medium, además se le agregaron dos gotas de eritrocitos y se incubó a 37 °C en una estufa por 24 horas (16).

Diseño experimental para el Ensayo Cometa

Se utilizaron concentraciones al 0,00125%, 0,0025% y 0,01% del extracto butanólico de *P. dolabriformis*, más buffer fosfato como control negativo y peróxido de hidrógeno como control positivo, donde cada concentración es igual a un tratamiento y cada donante de sangre constituye las repeticiones; las unidades experimentales constituyen el promedio de tres evaluaciones por cada tratamiento y dentro de cada repetición, haciendo un total de 45. Ajustándose a un diseño experimental en bloques completos al azar y un diseño experimental totalmente al azar.

Exposición de los linfocitos a diferentes concentraciones del extracto butanólico de *Peperomia dolabriformis*

Los linfocitos fueron recolectados en tubos de 1,5 mL, y se centrifugaron a 1.500 rpm por 5 minutos, eliminando el sobrenadante, obteniendo el pellet. Se realizó la re-suspensión en 250 µL de buffer fosfato 1X, para luego someterlos a los diferentes tratamientos. Al grupo control negativo se colocó en buffer fosfato (PBS 1X), al grupo control positivo se colocó peróxido de hidrógeno a una concentración 100 µM, y los otros tres grupos fueron expuestos a las concentraciones de 0,00125%, 0,0025% y 0,01% del extracto butanólico por 30 minutos (17).

Electroforesis alcalina en gel de células (SCGE) o ensayo cometa

Se utilizaron láminas portaobjetos de la marca G & C, colocando una capa de agarosa de punto de fusión normal (NMP) al 1%, sobre esta se agregó una segunda capa de agarosa de bajo punto de fusión (LMP) al 1%, en la que se hallaban los linfocitos (18). Para la primera capa de agarosa en las láminas portaobjetos G & C, se colocaron 140 µL de agarosa normal al 1% a una temperatura de 65 °C, estas se llevaron a refrigerar por 5 minutos a 4 °C para su solidificación. Para la segunda capa de agarosa se tomó 70 µL de linfocitos de cada tratamiento, y se mezcló con 140 µL de agarosa de bajo punto de fusión (ALMP) al 1% a 37 °C, luego se colocó sobre la primera capa de agarosa normal y se recubrió con una laminilla, las lámi-

nas se llevaron a refrigerar por 5 minutos a 4 °C para su solidificación (18).

Buffer de lisis

Se retiró la laminilla y las láminas se colocaron en un vaso coplin conteniendo el buffer de lisis (EDTA 0,1M, NaCl 2,5M, Tris HCl 10mM más Triton X-100), durante 16 horas a 4 °C, para eliminar la membrana celular de los linfocitos (17).

Electroforesis

Las láminas se colocaron en la cámara de electroforesis con buffer alcalino de pH >13 (NaOH 300 mM y EDTA 1 mM), a una temperatura de 4 °C, por 20 minutos. Luego se encendió la cámara a 15V, 300mA por 40 minutos (17). Para la coloración las láminas fueron coloreadas con 75µL de naranja de acridina en oscuridad.

Neutralización

Después de la electroforesis, se colocaron las láminas en el vaso coplin con PBS 1X por tres minutos. Esto se repitió cuatro veces para eliminar las sales que provocan “ruido de fondo” del naranja de acridina utilizado como colorante, cuando son vistas a través del microscopio de fluorescencia (18). Para la fijación, las láminas fueron sumergidas en alcohol de 96 °C por cinco minutos y luego se dejaron secar al medio ambiente en oscuridad (19).

Observación de los linfocitos

Se utilizó el microscopio de fluorescencia marca Olympus DP72, con el objetivo 10X y filtro N° 1, donde se capturaron las imágenes con el software DP2-BSW (20).

Evaluación del efecto genotóxico

Las imágenes fueron guardadas en formato “bmp”, y fueron procesadas con el software Comet Score™. Los parámetros utilizados para cuantificar el daño del ADN fueron: % DNA in Tail, Tail Moment y Olive moment. % DNA in Tail se define como el porcentaje de ADN dañado que ha migrado en la electroforesis, y el Olive Tail Moment se define por el porcentaje de ADN en la cola multiplicado por la longitud entre el centro de la cabeza y la cola (21).

Análisis estadístico

Los datos obtenidos a partir del análisis utilizando el software Comet Score™, fueron organizados en figuras, luego se procedió a realizar el análisis de varianza y, posteriormente, se aplicó la prueba de comparación múltiple de Tukey ($p < 0,05$) utilizando el programa estadístico IBM SPSS versión 22 (22).

Aspectos éticos

La investigación se llevó a cabo bajo las normas éticas internacionales, velando por los derechos y bienestar de los participantes; a los donantes de la muestra sanguínea se les hizo firmar un consentimiento informado, la participación fue voluntaria y la información se trabajó con confidencialidad.

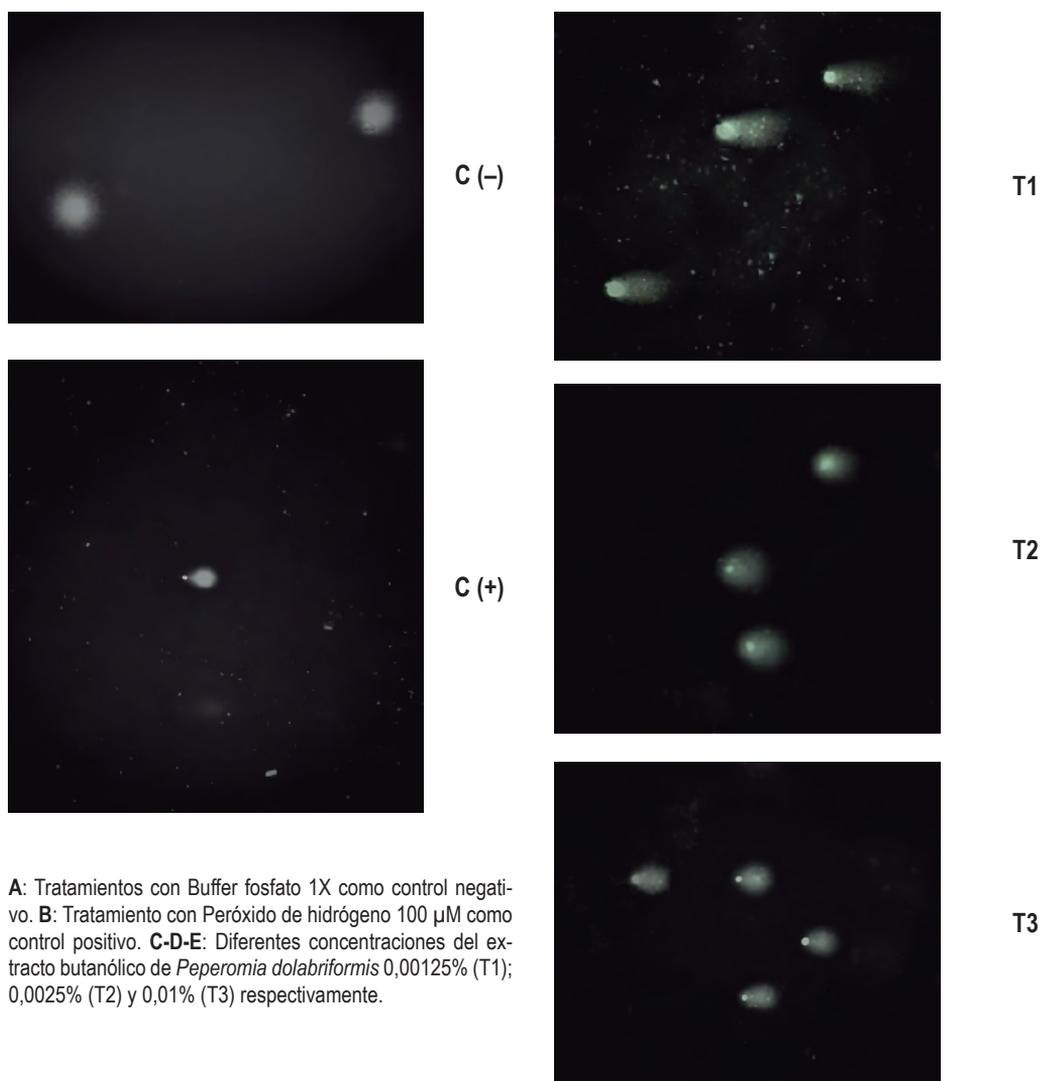
RESULTADOS

En la figura 1, se observa el daño genético en los linfocitos humanos producido por el extracto butanólico de *P. dola-*

briformis, donde se aprecia que, a mayor concentración, mayor es la migración del ADN en la cola del “cometa”. En la misma figura 1, muestra al linfocito expuesto al control negativo PBS, observándose ligero daño basal, así como el daño del control positivo peróxido de hidrógeno, mostrando una cabeza con poco ADN y una cola con abundante material genético degradado.

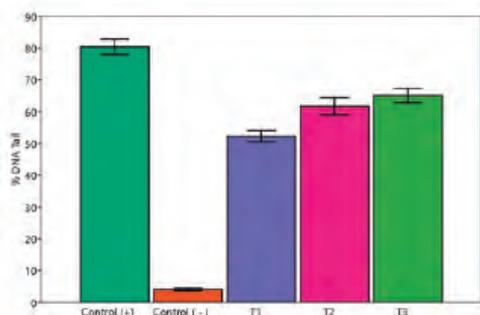
Los promedios de los parámetros % DNA in Tail, Tail Moment y el Olive Moment expuestos a diferentes concentraciones del extracto butanólico de *P. dolabriformis*, se indica en las figuras 2,3 y 4.

Figura 1. Electroforesis alcalina en gel de células individuales (SCGE) o ensayo cometa (10x).



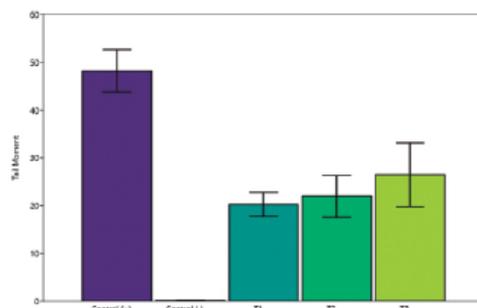
A: Tratamientos con Buffer fosfato 1X como control negativo. B: Tratamiento con Peróxido de hidrógeno 100 μ M como control positivo. C-D-E: Diferentes concentraciones del extracto butanólico de *Peperomia dolabriformis* 0,00125% (T1); 0,0025% (T2) y 0,01% (T3) respectivamente.

Figura 2. Medición promedio del parámetro % DNA in Tail en linfocitos humanos expuestos a las diferentes concentraciones del extracto butanólico de *Peperomia dolabriformis* "congona de zorro"



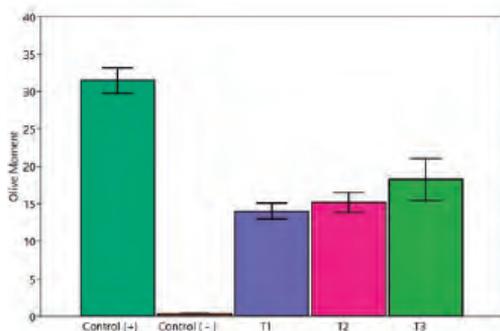
Control (-): Buffer fosfato (PBS)1X
Control (+): peróxido de hidrogeno 100 µM
T1: 0,00125% de extracto butanólico de *P. dolabriformis*
T2: 0,0025% de extracto butanólico de *P. dolabriformis*
T3: 0,01% de extracto butanólico de *P. dolabriformis*

Figura 3. Medición Promedio del parámetro Tail Moment en linfocitos humanos expuestos a las diferentes concentraciones del extracto butanólico de *Peperomia dolabriformis* "congona de zorro"



Control (-): Buffer fosfato (PBS)1X
Control (+): Peróxido de hidrogeno 100 µM
T1: 0,00125% de extracto butanólico de *P. dolabriformis*.
T2: 0,0025% de extracto butanólico de *P. dolabriformis*.
T3: 0,01% de extracto butanólico de *P. dolabriformis*.

Figura 4. Medición promedio del parámetro Olive Moment en linfocitos humanos expuestos a las diferentes concentraciones del extracto butanólico de *Peperomia dolabriformis* var. *dolabriformis* "congona de zorro"



Control (-): Buffer PBS1X
Control (+): peróxido de hidrogeno 100 µM
T1: 0,00125% de extracto butanólico de *P. dolabriformis*.
T2: 0,0025% de extracto butanólico de *P. dolabriformis*.
T3: 0,01% de extracto butanólico de *P. dolabriformis*.

DISCUSIÓN

El daño en el material genético producido por *P. dolabriformis* y por el control positivo (H_2O_2), se logró discriminar

visualmente a través del microscopio de fluorescencia, mediante la observación del tamaño de la cabeza y de la cola del cometa. Se observó una menor migración del ADN en la cola, cuando se usa menor concentración de *P. dolabriformis*. Sin embargo, se aprecia que a mayor concentración de *P. dolabriformis* menor tamaño de la cabeza (Figura 1). La técnica mediante la discriminación visual del daño genético lo determinó Collins dando como patrón cinco tipos de daño del cero al cuatro (23).

En la misma figura 1, el control negativo con buffer fosfato, muestra un ligero daño basal, producto de la manipulación de las muestras y de la electroforesis (24). En el control positivo, se observa que la migración del ADN es mayor, producto de la oxidación de las guaninas y el rompimiento de los enlaces fosfodiéster y utilizando peróxido de hidrógeno (H_2O_2), se detectó mayor daño en el ADN en regiones alcali-lábiles tales como sitios apurínicos y apirimídínicos fosfotriésteres (25).

En cuanto a los tratamientos de *P. dolabriformis*, la concentración de 0,01% (T3) tuvo mayor efecto genotóxico, con una media entre los tres donantes del 65,06% de ADN en la cola. El T1 presentó menor porcentaje de ADN dañado con 52,26% en la cola. Por otro lado, se observó que conforme la concentración de *P. dolabriformis* aumenta, el porcentaje de ADN migrado en la cola se incrementa (Figuras 1 y 2). Resultados de citotoxicidad utilizando *P. duclouxii* y *P. dindygulensis* mostraron un potente efecto inhibitorio y citotóxico en líneas celulares WI-38, VA-13 y HepG2 (26). Investigadores detectaron efecto citotóxico

en células C8166 con los fitoconstituyentes peperominas A, B y C y otros lignanos aislados de *P. heyneana* (27). Así también, encontraron efecto genotóxico y apoptótico en células V79 con *P. tuberculatum* (28).

El ADN dañado encontrado en los linfocitos humanos utilizando el extracto butanólico de *P. dolabriformis*, es menor al peróxido de hidrógeno (control positivo) alcanzando un valor máximo de 80,39% de ADN que migró a la cola (Figuras 1 y 2), debido a la oxidación de la desoxiguanosina por parte del O_2 en el ADN produciendo rupturas y productos como la 8-oxo-2'-desoxiguanosina (8-oxo-dG) (29). Los niveles de daño genotóxico con respecto al % DNA in Tail en los tratamientos T1, T2 y T3 mostraron una media progresiva del 52,26%, 61,68% y 65,06% respectivamente (Figura 2). Resultados diferentes a los obtenidos en estudios realizados con *P. jericóense*, en el que se demostró poco daño genético en 58% de las células, a una concentración de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (30).

El daño genético producido por *P. dolabriformis*, se debería a la presencia de sus fitoconstituyentes totales como los fenoles y catequinas que generan H_2O_2 por la oxidación de estos compuestos (30). Las especies reactivas de oxígeno (ROS) como la 8-Hydroxyguanine (8-oxoG), provoca las lesiones por los radicales oxígenos, produciendo las rupturas a nivel de ADN (31). Otros estudios han encontrado que las catequinas inducen la apoptosis celular y fragmentación celular, así como, la condensación de la cromatina (32).

Los terpenos presentes en *P. dolabriformis*, posiblemente tengan efecto inhibitorio sobre los linfocitos humanos, provocando la apoptosis celular, evidenciado por la medición de la inhibición de la topoisomerasa II (33). Investigadores afirman que los terpenos aumentan las especies reactivas de oxígeno (ROS), incrementan el daño en el ADN, produciendo citotoxicidad y apoptosis celular en diferentes líneas celulares como (HeLa), carcinoma de colon humano (HT-29), adenocarcinoma colorectal (Caco-2), adenocarcinoma de mama (MCF-7), hepatoma (HepG2), cáncer de vejiga (T24) y fibroblastos de pulmón normal (MRC5) (34). Por otra parte, el daño genético producido por las diferentes concentraciones de *P. dolabriformis* en los tres donantes no es el mismo, el % DNA in Tail es de 52,26%, 61,68% y 65,03% (Figura 2). Estudios de los extractos vegetales sobre el daño genético, han mostrado similares resultados (35). Esto se debería a la diferente capacidad de reparación del daño en el ADN, la diferente susceptibilidad de los donantes, o la exposición al medio ambiente de cada donante (36).

En cuanto al parámetro Tail Moment, se observó que los valores aumentan en los diferentes tratamientos con respecto al control negativo y disminuyen con respecto al control positivo (Figura 3). La media entre los tres donantes indica que el valor máximo lo presenta el T3 con 26,49 a una concentración de 0,01% de extracto butanólico de

P. dolabriformis. El T1 y T2 presentó una media de daño similar con 20,26 y 21,94 respectivamente. Esto quizás debido al daño oxidativo producido por los flavonoides, fenoles, catequinas y terpenos que tienen efecto sobre el ADN y las enzimas encargadas en la replicación, ocasionando rupturas e incluso apoptosis celular (37). Por otro lado, se midió el % DNA in Tail en células de ratones B6C3F, usando el test de micronúcleos en eritrocitos humanos, encontrando niveles bajos de daño genético (38). En cuanto al parámetro Olive Moment, se observa un efecto similar de daño encontrado en el Tail Moment; el daño sobre el ADN aumenta con respecto a la concentración del extracto butanólico de *P. dolabriformis* 14,03 en el T1; 15,16 en el T2 y 18,23 en T3 (Figura 4). Esto se debería a los diferentes fitoconstituyentes de *P. dolabriformis* rompiendo los enlaces fosfato y oxidando los sitios purínicos y pirimidínicos, ocasionando la fragmentación de la doble cadena del ADN (DSB) y de la simple cadena del ADN (SSB); ocasionando efectos clastogénicos incluso apoptosis celular (39). Cabe señalar que las especies reactivas de oxígeno (ROS) ocasionan peroxidación lipídica, oxidación de las proteínas y oxidación del ADN (40). Ambos parámetros, el Tail Moment y el Olive Moment, usan diferentes fórmulas para expresar el Olive Tail Moment, dando como consecuencia, una magnitud de daño expresado en el número de piezas rotas y por lo tanto la migración detectable de ADN (11). Por otra parte, recomiendan el uso del parámetro Tail Moment para el biomonitoreo en humanos (41).

CONCLUSIONES

Las diferentes concentraciones del extracto butanólico de *Peperomia dolabriformis* ocasionaron genotoxicidad en el ADN de linfocitos humanos mediante el ensayo cometa.

El ensayo cometa evidenció que a la concentración de 0,01% del extracto butanólico de *Peperomia dolabriformis* ocasionó una genotoxicidad del 65,06% de "DNA in Tail" y 26,49 en el "Tail Moment".

BIBLIOGRAFÍA

1. Pino G, Fernández R, Samain M. Succulent Peruvian Species of *Peperomia* Subgenus *Panicularia*. *Haseltonia*. 2021, 27(1),116-129.
2. Pino G, Ciez N, Wanke S, Samain M. New Succulent Window Leaved *Peperomias* from Peru. *Haseltonia*. 2012,18:3-26.
3. León B. Piperaceae endémicas del Perú. *Revista peruana de biología*. 2006, 13(2): 492-563.
4. Pino G, Klopfenstein, O, Cieza N. Four new *peperomias* from northern Peru. *Haseltonia*. 2005, 11:103-112.
5. Busmann R, Malca G, Glenn A, Sharon D, Nilsen B, Parris, D, et al. Toxicity of medicinal plants used in traditio-

- nal medicine in Northern Peru. Journal of Ethnopharmacology. 2011, 137(1):121-140.
6. Levan A. The effect of colchicine on root mitoses in *Allium*. Hereditas. 1938, 24(4): 471-486.
7. Sommer S, Buraczewska I, Kruszewski M. Micronucleus Assay: The State of Art, and Future Directions. Int J Mol Sci. 2020, 21(4):1534.
8. Ostling D, Johanson K. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. Biochem Biophys Res Commun. 1984, 123(1): 291-298.
9. Klaude M, Eriksson S, Nygren J, Ahnstrom, G. The comet assay: mechanisms and technical considerations. Mutat Res. 1996, 362(2): 89-96.
10. Azqueta A, Muruzabal D, Boutet-Robinet E, Milic M, Dusinska M, Brunborg G, et al. Technical recommendations to perform the alkaline standard and enzyme-modified comet assay in human biomonitoring studies, Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen. 2019, 843:24-32.
11. Dhawan A, Bajpayee M, Parmar, D. Comet assay: a reliable tool for the assessment of DNA damage in different models. Cell Bio Toxicol. 2009, 25(1):5-32.
12. Bankoglu E, Mukama E, Katzke T, Stipp V, Johnson F, Kühn T, et al. Short- and long-term reproducibility of the COMET assay for measuring DNA damage biomarkers in frozen blood samples of the EPIC-Heidelberg cohort. Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen. 2022, 874-875:503442.
13. Azqueta A, Langie S, Boutet-Robinet E, Duthie S, Ladeira C, Möller P, et al. DNA repair as a human biomonitoring tool: Comet assay approaches. Mutat Res Rev Mutat Res. 2019, 781:71-87.
14. Azqueta A, Sabine A, Slyskova J, Collins A. Measurement of DNA base and nucleotide excision repair activities in mammalian cells and tissues using the comet assay-A methodological overview. DNA Repair (Amst). 2013, 12(11):1007-10.
15. König G, Reetz M, Thiel W. 1-Butanol as a Solvent for Efficient Extraction of Polar Compounds from Aqueous Medium: Theoretical and Practical Aspects. The Journal of Physical Chemistry B. 2018, 122(27): 6975-6988.
16. Olive P. Cell proliferation as a requirement for development of the contact effect in Chinese hamster V79 Spheroids. Radiation Research. 1989, 117:79-92.
17. Singh N, Tice R, Stephens R, Schneider E. A microgel electrophoresis technique for the direct quantitation of DNA damage and repair in individual fibroblasts cultured on microscope slides. Mutat Res. 1991, 252(3):289-96.
18. Singh N, Khan A. Acetaldehyde: genotoxicity and cytotoxicity in human lymphocytes. Mutat Res. 1995, 337(1):9-17.
19. Singh N, Stephens R. Microgel electrophoresis: sensitivity, mechanisms, and DNA electrostretching. Mutat Res. 1997, 383:167-175.
20. Collins A, Dobson V, Dusinská M, Kennedy D, Stetina R. The comet assay: What can it really tell us? Mutat Res. 1997, 375:183-193.
21. Olive P, Banáth J, Durand R. Heterogeneity in Radiation-Induced DNA Damage and Repair in Tumor and Normal Cells Measured Using the "Comet" Assay. Radiation Research. 1990, 122:86-94.
22. Vasallo J. Estadística aplicada a las ciencias de la salud. Barcelona. Elsevier. 2021.
23. Collins A, Ma M, Duthie S. The kinetics of repair of oxidative DNA damage (strand breaks and oxidised pyrimidines) in human cells. Mutat Res. 1995, 336(1):69-77.
24. Odongo G, Skatchkov I, Herz C, Lamy E. Optimization of the alkaline comet assay for easy repair capacity quantification of oxidative DNA damage in PBMC from human volunteers using aphidicolin block. DNA Repair (Amst). 2019, 77:58-64.
25. Guo S, Fang J, Xu W, Ortega J, Chang-Yi L, Gu L, et al. Interplay between H3K36me3, methyltransferase SETD2, and mismatch recognition protein MutSα facilitates processing of oxidative DNA damage in human cells. J Biol Chem. 2022, 298(7): 102102.
26. Li N, Wu J, Hasegawa T, Sakai J, Bai L, Wang L, et al. Bioactive Lignans from *Peperomia duclouxii*, J Nat Prod. 2007, 70(4):544-8.
27. Zhang G, Li N, Wang Y, Zheng Y, Zhang Z, Wang M. Bioactive Lignans from *Peperomia heyneana*. J Nat Prod. 2007, 70(4):662-4.
28. Pereira D, Moura D, Rosa R, Vasconcellos M, Romano A, Moraes M, et al. Evaluation of the genotoxicity of piperazine, an alkamide of *Piper tuberculatum*, in yeast and mammalian V79 cells. Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen. 2008, 652(2): 164-174.
29. Bhatia S, Wells P. Quantifying Activity for Repair of the DNA Lesion 8-Oxoguanine by Oxoguanine Glycosylase 1 (OGG1) in Mouse Adult and Fetal Brain Nuclear Extracts Using Biotin-Labeled DNA. Methods Mol Biol. 2019, 1965:329-349.
30. Li Y, Pan J, Gou M. The Anti-Proliferation, Cycle Arrest and Apoptotic Inducing Activity of Peperomin E on Prostate Cancer PC-3 Cell Line. Molecules. 2019, 24(8):1472.
31. Jiang Y, Miles P. Generation of H₂O₂ during enzymic oxidation of catechin. Phytochem. 1993, 33:29-34.
32. Jakubczyk K, Dec K, Kałduńska J, Kawczuga D, Kochman J, Janda K. Reactive oxygen species -sources, functions, oxidative damage. Pol Merkur Lekarski. 2020 Apr 22;48(284):124-127.
33. Miyata S, Wang L, Yoshida C, Kitanaka S. Inhibition of cellular proliferation by diterpenes, topoisomerase II inhibitor. Bioorg Med Chem. 2006, 14:2048-51.
34. Momtaz S, Hussein A, Ostad S, Abdullahi M, Lall N. Growth inhibition and induction of apoptosis in human cancerous HeLa cells by *Maytenus procumbens*. Food Chem Toxicol. 2013, 51:38-45.

35. Viau C., D. J. Moura, V. Facundo, J. Saffi. The natural triterpene 3 β , 6 β , 16 β -trihydroxy-lup-20 (29)-ene obtained from the flowers of *Combretum leprosum* induces apoptosis in MCF-7 breast cancer cells. BMC Complemen and Altern Med. 2014, 14: 280.
36. Vodicka P, Vodenkova S, Opattova A, Vodickova L. DNA damage and repair measured by comet assay in cancer patients, Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis. 2019, 843:95-110.
37. Wiesner-Reinhold M, Dutra J, Herz C, Thu H, Baldermann S, Neugart S, et al. Subsequent treatment of leafy vegetables with low doses of UVB-radiation does not provoke cytotoxicity, genotoxicity, or oxidative stress in a human liver cell model. Food Bioscience. 2021, 101327.
38. Soares V, Varanda E, Raddi M. In vitro basal and metabolism-mediated cytotoxicity of flavonoids. Food Chem Toxicol. 2006, 44(6):835-8.
39. Drag-Zalesinska M, Wysocka T, Borska S, Drag M, Poreba M, Choromanska A, et al. The new esters derivatives of betulin and betulinic acid in epidermoid 4 squamous carcinoma treatment-In vitro studies. Biomed Pharmacother. 2015, 72:91-97.
40. He X, Xue J, Shi L, Kong Y, Zhan Q, Sun Y, Zhang Q, et al. Recent antioxidative nanomaterials toward wound dressing and disease treatment via ROS scavenging. Materials Today Nano. 2022, 100149.
41. Azqueta A, Muruzábal D, Boutet-Robinet E, Milic M, Dusinska M, Brunborg G, et al. Technical recommendations to perform the alkaline standard and enzyme-modified comet assay in human biomonitoring studies. Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis. 2019, 843:24-32.