



UNAM IZTACALA

Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Estudios Superiores Iztacala

Determinación del posible efecto clastogénico de
Psittacanthus calyculatus en sangre periférica
de ratón CD1

TESIS
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
LICENCIADA EN BIOLOGÍA
P R E S E N T A
Paola Velasco Lara

Director: Dr. Saúl Flores Maya



Los Reyes Iztacala, Edo. de México,

2011.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



"Nuestros sueños pueden convertirse en realidad si los deseamos tanto como para ir tras ellos".



"Cuando creíamos que teníamos todas las respuestas, de pronto, cambiaron todas las preguntas".

AGRADECIMIENTOS

Al escribir esta parte del documento siento una especial satisfacción. En parte porque representa el final de un arduo trabajo, pero sobre todo porque me permite expresar mi agradecimiento a todas aquellas personas que me han acompañado en este camino y de una forma a otra han contribuido a la culminación de esta meta.

Gracias al M. C. Ángel Duran Díaz por apoyarme a comprender y facilitarme el análisis estadístico del presente trabajo de tesis.

Un especial agradecimiento a la Dra. Sandra Díaz Barriga del Lab. de Farmaco biología de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. UNAM, por brindarme su apoyo, conocimiento. Gracias por sus enseñanzas y consejos.

Expresar mi gratitud al Dr. Guillermo Avila Acebedo y a la Dra. Ana García Bores del Lab. de Fitoquímica de la UBIPRO, de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala. UNAM, por haberme proporcionado el extracto y por ayudarme en mi formación profesional y personal.

Gracias a ese grupo de amigos que consolide a lo largo de mi carrera profesional por su sincera amistad, confianza y apoyo.

Especial gratitud al Dr. Saúl Flores Maya del laboratorios de Recursos naturales de la UBIBRO de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala. UNAM, por confiar en mí y sobre todo por brindarme su confianza incondicional y su entusiasta ayuda en los experimentos. Gracias.

Gracias a mi familia, por ser como son y por estar siempre ahí, ya que ustedes fueron mi fuerza para seguir adelante. A ti mama te debo el haberme enseñado hacer una mejor persona, pero sobre todo por demostrarme que no hay imposibles. Y a ti papa que aunque ya no estas se que estarías muy orgulloso por mi logro. Y en especial a ti Javier, por tu paciencia, comprensión y por compartir tantas y tantas cosas. GRACIAS.

“Ha sido un camino largo y difícil, pero por fin he llegado a la cima”.

Mi más sincera y profunda gratitud a todos.

ÍNDICE

	PÁGINAS
RESUMEN.....	1
INTRODUCCIÓN.....	2
ANTECEDENTES	5
MARCO TEÓRICO	
1. MUTAGÉNESIS.....	6
1.1. Pruebas de mutagénesis <i>in vivo</i>	
1.1.1. Prueba de micronúcleos	9
1.2. Pruebas de micronúcleos en ratón	12
1.2.1. Importancia de la técnica de micronúcleos	13
2. ERITROPOYESIS	14
2.1. Eritrocitos policromáticos	16
2.1.1. Inclusiones eritrocitarias.....	18
3. Metabolismo xenobiótico.....	19
3.1. Reacciones de biotransformación.....	20
4. <i>Psittacanthus calyculatus</i> (Muérdago)	21
4.1. Composición química de <i>Psittacanthus calyculatus</i> (Muérdago)	22
4.2. Importancia de <i>Psittacanthus calyculatus</i> y justificación del estudio	23
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	24
HIPÓTESIS	24
OBJETIVO GENERAL	24
OBJETIVOS PARTICULARES.....	24
MATERIAL Y MÉTODOS	
5.1. Material biológico	25
5.2. Extracto acuoso de <i>Psittacanthus calyculatus</i>	25
5.3. Preparación de las concentraciones	26

5.4. Administración del extracto y distribución de los ratones	26
5.5. Toma de muestra	27
5.6. Fijación de laminillas	27
5.7. Tinción con Giemsa al 5%.....	27
5.8. Observación al microscopio	28
5.9. Análisis estadístico.....	28
RESULTADOS	29
ANÁLISIS DE RESULTADOS.....	40
CONCLUSIONES.....	42
REFERENCIAS	43
APÉNDICE I. Fotografías de sangre periférica de ratón CD-1	47
APÉNDICE II. Preparación del colorante y elaboración de la solución amortiguadora	49
ABREVIATURAS	50

Determinación del posible efecto clastogénico del extracto acuoso de *Psittacanthus calyculatus* en sangre periférica de ratón cd1

RESUMEN

El empleo de las plantas, ya sea con fines alimenticios o medicinales se ha practicado desde la antigüedad y en algunos casos no se ha comprobado de manera científica su eficacia. El uso frecuente de ciertas plantas medicinales por la población hace que sea de interés para la investigación, como por ejemplo tenemos al muérdago, *Psittacanthus calyculatus*, el cual tiene como principales constituyentes a los polifenoles tales como el ácido gálico y taninos hidrolizables. Con respecto al muérdago (*P. calyculatus*), se realizó un estudio en el que se determinó que tiene propiedades hipoglucemiantes en dosis de 200 mg/Kg de peso y 400 mg/Kg de peso. Por esta razón, en el presente trabajo se pretendió determinar si el extracto acuoso de *P. calyculatus* tiene o no propiedades genotóxicas a través de un ensayo de micronúcleos en sangre periférica de ratón cepa CD1. Actualmente en la literatura científica mexicana existen pocos datos sobre la acción mutagénica que poseen los extractos de plantas medicinales consumidas por la población. Como monitor de la clastogenicidad aguda del extracto acuoso de *P. calyculatus* se empleó la prueba de micronúcleos *in vivo*. En el experimento se utilizaron 100 ratones machos blancos CD-1 de 5 y 6 y de 4 y 7 semanas de edad, los cuales fueron divididos equitativamente en dos experimentos. A cada experimento le correspondieron 5 lotes de 10 ratones. Para ambos experimentos el 1º lote fue el grupo control negativo donde se empleó agua destilada, el 2º lote correspondió al control positivo utilizando ifosfamida a 40 mg/ 10 mL y los lotes 3º, 4º y 5º recibieron tratamiento con el extracto acuoso de *P. calyculatus* a razón de 200 mg/Kg y 400 mg/Kg de peso administrados en diferentes intervalos de tiempo, siendo éstos a las 24 hs, 48 hs. y 72 hs., respectivamente, por lo que cada lote fue dividido en dos partes con 5 animales cada uno. La administración de las concentraciones fue por vía intraperitoneal. Transcurrido este tiempo se tomó una muestra de sangre periférica obtenida de la cola del ratón. Se prepararon 3 laminillas por cada ratón, y se evaluó la frecuencia de eritrocitos policromáticos (EP), eritrocitos normocromáticos (EN) y el porcentaje de micronúcleos en eritrocitos policromáticos (%MCNEP) en 2000 células sanguíneas para calcular el índice de citotoxicidad (%EP) y el índice de genotoxicidad (% MCNEP). El extracto acuoso de *P. calyculatus* no es clastogénico en células de sangre periférica de ratón debido a que se observó poca o nula presencia de MCNEP. Asimismo, ningún ratón murió por las dosis administradas. Sin embargo los resultados mostraron que la dosis de 400 mg/Kg de peso del extracto acuoso es ligeramente citotóxico mientras que la dosis de 200 mg/Kg del extracto acuosos de *P. calyculatus* comparándolo con el control negativo no es citotóxico ni genotóxico.

Palabras clave: clastogénico, eritrocitos normocromáticos, eritrocitos policromáticos, micronúcleos, *Psittacanthus calyculatus*.

INTRODUCCIÓN

La evaluación del riesgo de los productos químicos para el hombre conlleva a la realización de ensayos toxicológicos que incluyen los de genotoxicidad (Attia *et al.* 2009). Las pruebas de rutina de genotoxicidad tienen al menos 20 años de progreso, durante los cuales, numerosas pruebas han sido introducidas y desarrolladas. En la actualidad no se conoce algún estudio que por si solo pueda suministrar los datos necesarios para estimar el riesgo genético que constituyen determinados productos químicos o agentes físicos, esto debido a la gran cantidad de efectos genotóxicos existentes (Remigio *et al.*, 2007),

Los grupos de trabajo de la Unión Europea (EU), la Organización Económica de Cooperación y Desarrollo Económico (OECD) y recientemente, la Conferencia Internacional de Amortización de Requerimientos Técnicos para el Registro de Productos Farmacéuticos de uso Humano (ICH) han definido el uso de baterías de ensayos de genotoxicidad, en las que se emplean modelos biológicos, tales como: peces, mamíferos pequeños, células humanas, moscas de la fruta, vegetales y bacterias (Hayashi *et al.*, 2000).

En el ámbito internacional, la evaluación genotóxica de nuevos medicamentos es un requisito de carácter obligatorio y, aunque no existe un consenso generalizado sobre qué tipos y qué cantidad de pruebas de genotoxicidad deben realizarse, existen criterios coincidentes para clasificar en genotóxicos o no, a los productos químicos, de acuerdo a los resultados obtenidos mediante dichos ensayos (Hayashi *et al.*, 2000).

Entre las pruebas genotóxicas con mamíferos que existen, el ensayo de micronúcleos (MCN) en células de ratón ha sido ampliamente utilizado como un indicador de la genotoxicidad de clastógenos químicos *in vivo*. También se emplea en epidemiología molecular como un biomarcador de daño cromosómico y de la inestabilidad del genoma, así mismo es un sustituto de criterios indirectos de valoración en las células, que presuntamente reflejan alteraciones cromosómicas más específicas pertenecientes a la carcinogénesis (Iarmarcovai *et al.*, 2007).

Los ensayos de MCN juegan un papel importante debido a que son muy sensibles a los agentes clastogénicos que llegan a los tejidos diana, por lo que la sensibilidad de la prueba determina en gran medida el efecto que tiene la forma activa de la sustancia sobre los órganos diana (Hayashi *et al.*, 2000).

La prueba de MCN detecta el efecto de los agentes mutagénicos, sobre los cromosomas, mediante la identificación de fragmentos acéntricos y/o cromosómicos que quedan rezagados en la mitosis, los cuales quedan fuera del núcleo formando tales estructuras. La técnica permite detectar tanto agentes clastogénicos (que rompen cromosomas) como aneuploidogénicos (que afectan el uso mitótico) (Schmid, 1975).

Originalmente, la prueba de MCN fue desarrollada en eritrocitos de médula ósea de ratones pero, posteriormente se modificó para ser aplicada en diversas especies y tejidos. La identificación de MCN en eritrocitos de sangre periférica de mamíferos, aves, reptiles y anfibios depende básicamente de la eficiencia del sistema retículo endotelial que es el responsable de eliminar los eritrocitos anómalos y/o viejos. A mayor eficiencia de eliminación es menor la posibilidad de observar eritrocitos con micronúcleos (EMCN) independientemente de si el organismo está expuesto a agentes genotóxicos o no. Esto ha sido ampliamente documentado con el objetivo de seleccionar las especies con mayor sensibilidad, que posteriormente, puedan ser utilizadas como indicadores o monitores biológicos en presencia de agentes tóxicos al genoma o genotóxicos (Macgregor *et al.*, 1990).

Estudios realizados anteriormente acerca del efecto genotóxico de mezclas complejas obtenidas de plantas usadas en la medicina tradicional amplían los conocimientos acerca del potencial terapéutico que poseen dichas plantas y que a su vez contribuyen al desarrollo de la industria biofarmacéutica (Remigio *et al.*, 2007). Las plantas son utilizadas por las personas para curar varias enfermedades como es el caso de *Psittacanthus calyculatus* y *Psittacanthus rhynchanthus* que son vegetales conocidos en México como los muérdagos. Éstas son plantas

parásitas o hemiparásitas obligadas. Y son empleadas en la medicina tradicional como relajantes, anticancerígenas y contra la hipertensión (Solís y Gómez, 2005).

El consumo indiscriminado de fármacos de origen vegetal por la población se correlaciona con la ocurrencia de enfermedades. Estos son elaborados a partir de extractos vegetales que constituyen mezclas complejas que potencialmente podrían contener un gran número de sustancias con propiedades mutagénicas y/o cancerígenas. Actualmente en la literatura científica mexicana existen pocos estudios sobre la acción mutagénica que poseen las plantas medicinales consumidas por la población. Debido a esto, el presente trabajo pretende determinar si el extracto acuoso de *Psittacanthus calyculatus* tiene o no propiedades genotóxicas a través de un ensayo de micronúcleos en sangre periférica de ratón CD1.

ANTECEDENTES

Remigio *et al.* (2007) analizaron el potencial clastogénico y aneugénico de un extracto hidroalcohólico de *Tamarindus indica* L., con ratones de la cepa NMRI de ambos sexos. Ellos determinaron que los índices de genotoxicidad fueron estadísticamente significativos, resultando clastogénico el extracto de *T. indica* ya que aumentó significativamente la frecuencia de micronúcleos de los eritrocitos policromados de la medula ósea. Además se demostró una relación dosis-respuesta.

Askin y Sultan (2007) investigaron el efecto citotóxico y genotóxico de extractos acuosos de *Lavandula stoechas* aplicado en raíces de *Allium cepa*. Estos autores encontraron que los extractos acuosos reducen el índice mitótico, también inducen la ruptura, adhesión, desviación de los polos y micronúcleos. Así mismo observaron que el efecto está relacionado con la concentración del extracto y por consiguiente demostró tener un efecto citotóxico y genotóxico.

Hayashi *et al.* (2000) formularon los procedimientos del ensayo de genotoxicidad, así como también la realización de propuestas para la diseño de protocolos en ensayos de micronúcleos, considerando repetición de tratamientos e integración de pruebas toxicológicas. Estos autores proponen que es aceptable la evaluación de la inducción de micronúcleos, la frecuencia de micronúcleos en eritrocitos de medula ósea y de sangre periférica, además de los intervalos de inducción y de aplicación de tratamientos.

Solís y Gómez (2005) realizaron un inventario de las especies de muérdago en la parte sur del Estado de Querétaro y sus alrededores. Estos autores determinaron 10 especies de 36 especímenes distintos. Ellos encontraron que su distribución está regida por la presencia de los hospederos, el tipo de vegetación y el grado de perturbación.

MARCO TEÓRICO

1. *Mutagénesis*

El hecho de que la información genética sea transmitida de generación en generación sin cambios aparentes asegura que las características de una especie se mantengan. Sin embargo esta información es susceptible de sufrir cambios de manera espontánea o bien inducidos por diversos agentes ambientales. Estas alteraciones son la fuente primaria de variabilidad genética y como tal es indispensable para que se produzca el fenómeno evolutivo. De hecho, la mutación es una de las propiedades genéticas esenciales del material hereditario (Luca y Seoane, 2008).

En un principio el término de mutación se aplicaba únicamente a aquellos cambios de la información genética heredables a la progenie, hoy el concepto se aplica a cualquier cambio heredable en el genotipo de un ser vivo (Luca y Seoane, 2008). Dichos cambios pueden ser clasificados en micro y macro mutaciones, en donde la única unidad genética capaz de mutar es el gen (segmentos de ADN). En los seres multicelulares, las mutaciones pueden ser heredadas cuando afectan a las células reproductivas o somáticas en la que la célula madre dañada hereda a su hija el mismo daño, propiciando una proliferación de las células con el mismo daño (Alteraciones de la información genética, 2009). Sin embargo no todas las mutaciones son benéficas en el desarrollo de una especie. Entre las alteraciones que se conocen se encuentran las aberraciones cromosómicas, las cuales se clasifican: en estructurales y numéricas. Las alteraciones en el número cromosómico pueden originarse como resultado de falta de disyunción (no separación de los cromosomas) o por un rezago en la anafase, ambos fenómenos pueden originarse tanto en la división meiótica como en la mitótica (Salamanca, 1992). Cuando el número cromosómico es múltiplo exacto del número haploide, se habla de un estado de euploidia, sin embargo cuando uno o varios cromosomas se encuentran involucrados, la alteración numérica se denomina aneuploidia. Estas últimas son más conocidas por sus repercusiones en el origen de alteraciones congénitas, como las trisomías encontradas en recién nacidos, que

es cuando se presenta un cromosoma adicional como en el caso del Síndrome de Down (47, XX o XY, + 21), las monosomias o la falta de un cromosoma como en el caso del Síndrome de Turner (45, X₀), las dobles trisomías, es decir, la presencia de dos cromosomas adicionales de distinto par cromosómico como en el caso de pacientes con un cromosoma X extra y Síndrome de Down (48, XXX, 21), las tetrasomias o la presencia de dos cromosomas adicionales del mismo par como en algunos casos de Síndrome de Klinefelter (48, XXXY). Otras aberraciones numéricas las constituyen las nulisomias o sea la falta total de un par cromosómico y los mosaicos o mixoploidias en las cuales dentro del mismo organismo se tienen dos o más líneas celulares una de las cuales es normal y la otra u otras se encuentran afectadas en su número cromosómico (Fig. 1), la producción de mosaicos se debe a la no disyunción de los cromosomas en la mitosis temprana después de la formación del cigoto (Luca y Seoane, 2008).

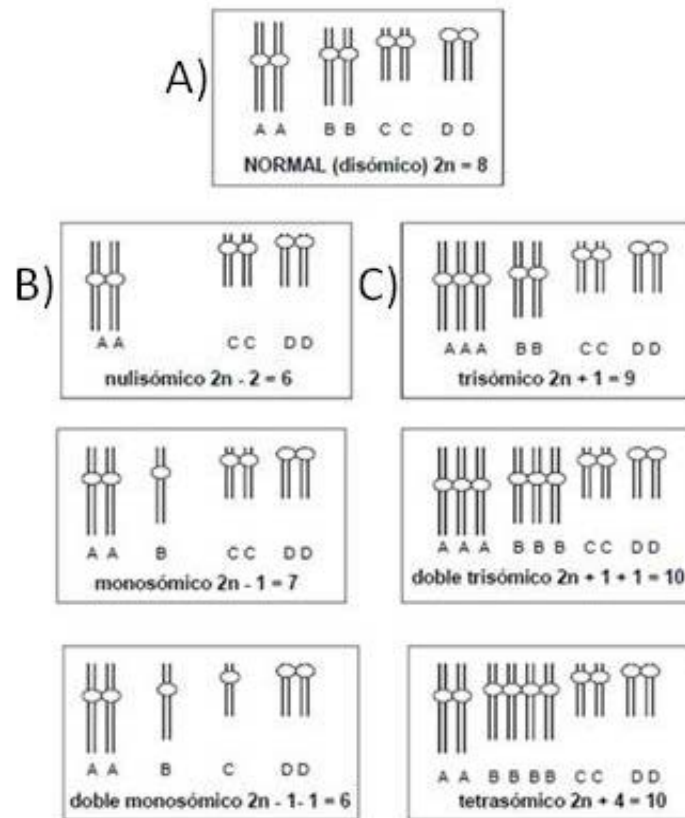


Fig. 1. Distintos ejemplos de aneuploidía. A) complemento cromosómico imaginario $2n = 8$. B) disminución en el número de cromosomas: nulisomía, monosomía y doble monosomía. C) aumento en el número de cromosomas: trisomía, doble trisomía y tetrasomía (Luca y Seoane, 2008).

Las aberraciones estructurales son ocasionadas por agentes clastógenicos, es decir aquellas sustancias que provocan la ruptura del cromosoma; cuando una ruptura se lleva a cabo se puede tener una restitución de la lesión, dando un genotipo sin alteración alguna. Sin embargo si se tiene una ruptura y no hay restitución, dan como resultado una pérdida del material genético, o bien una reunión inter o intracromosomal que repercute como un cambio estructural (Salamanca, 1992).

Dentro de las aberraciones intracromosómicas se tienen deleciones, inversiones, anillos e isocromosomas. Por otra parte para las aberraciones intercromosómicas se presentan las translocaciones simples, recíprocas y robertsonianas, así como la duplicación que es una forma particular de translocación (Luca y Seoane, 2008).

En el ciclo celular, las mutaciones se presentan con más probabilidad durante la etapa G1 por ser ésta la parte con mayor duración del ciclo, aunque en el caso de las mutaciones puntuales el periodo S parece ser la etapa más sensible para que ocurran (Núñez y Escalona, 2010).

Cuando se tiene una mutación y dependiendo de la línea celular en la que se produzca, se presentan cambios que repercuten en el desarrollo del individuo afectado. Así mismo, las mutaciones ocurren en células germinales éstas generalmente se traducen en productos afectados, infertilidad y abortos espontáneos. Las mutaciones en células somáticas es muy posible que se tengan alteraciones en los procesos metabólicos de ellas, lo cual repercute en el funcionamiento normal (Sánchez, 2010).

Por otro lado cuando las mutaciones son provocadas por un agente, es decir que no ocurren de manera espontánea, puede evaluarse el efecto del mutágeno con diversas técnicas. Los daños se presentan a nivel genético, las técnicas empleadas son preferentemente la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), southern blot (SB), northern blot (NB), western blot (WB), corrimiento electroforético en gel de agarosa (PAGE) e inmunodetección.

Existen muchas pruebas de mutagenicidad en seres vivos, que incluyen:

- a) Pruebas de cambio de pares de bases o en las pautas de lectura (mutaciones puntuales), que se evalúan en bacterias como *Echerichia coli*, *Salmonella thyphimurium* o *Bacillus subtilis*.
- b) Prueba para determinar aberraciones cromosómicas a partir de cultivos celulares.
- c) Inducción de mutaciones de células en cultivo.
- d) Prueba en *Drosophila melanogaster* de recesivos letales; mutación y recombinación somáticas.
- e) Evaluación de lesiones cromosómicas por el análisis de células en metafase o por prueba de MCN.
- f) Inducción de mutaciones en células germinales mediante la evaluación de dominantes letales en rata o ratón (Derache, 1990).

De estos se explica un grupo brevemente a continuación.

1.1. Prueba de mutagénesis in vivo

1.1.1 Prueba de micronúcleos

La prueba de MCN se realiza en diferentes tipos celulares: eritrocitos policromáticos de la médula ósea, cultivos de linfocitos de sangre periférica, eritrocitos jóvenes y maduros de la sangre periférica, queratinocitos, células de la mucosa bucal, hepatocitos de rata, células germinales y células de descamación de la vagina de la rata, entre otros (Hayashi *et al.*, 2000).

Los MCN son corpúsculos intracitoplasmáticos de cromatina, separados del núcleo principal y que se forman a partir de la ruptura de fragmentos cromosómicos acéntricos o bien por aquellos cromosomas que sufren un rezago

anafásico, lo cual se traduce en la aparición de un pequeño núcleo en las células anucleadas como los eritrocitos (Fig. 2) o bien en el citoplasma de nucleadas como linfocitos o espermatogonias. El incremento en su número es indicativo de un rezago anafásico o bien de la ruptura de cromosomas en una región acéntrica ocasionada por agentes clastogénicos (González y Gómez, 2006).

La existencia de MCN ha sido reconocida durante años, su asociación con el daño cromosómico fue bien conocida desde los primeros trabajos en el campo de la radiación. El primer intento de usar los MCN como monitores de daño citogenético parece ser el reportado por Evans y colaboradores en 1959, ellos usaron la frecuencia de los MCN para cuantificar el daño citogenético inducido por los rayos gamma y los neutrones en ausencia y presencia del oxígeno. Dentro de los resultados obtenidos se observó en las cromátides intercambios asimétricos y simétricos incompletos que dan el incremento de fragmentos acéntricos en la mitosis (Macgregor *et al.*, 1990).

Al comienzo de los años sesenta Schmid y colaboradores, así como Heddle en 1973 iniciaron los estudios para determinar qué parámetros podrían servir como indicadores útiles del daño citogenético en la medula ósea *in vivo*. Este trabajo llegó a la conclusión de que la incidencia de eritrocitos policromáticos micronucleados (MCNEP) era un indicador útil en el daño citogenético en medula ósea. Gracias al trabajo realizado por estos autores fue posible el desarrollo de una prueba simple *in vivo*, donde la identificación de MCNEP, nos permite evaluar el daño citogenético, siendo esta prueba usada ampliamente y referida comúnmente como “Prueba de MCN” (Schmid, 1975).

No se requiere de un cariotipo, ya que los MCN formados durante la división celular persisten al menos durante la siguiente interfase. El daño ocurrido en algún estadio del ciclo celular puede ser observable como MCN con solo un ciclo celular transcurrido y un tiempo de fijación simple. En la práctica es necesario asegurar que la división no haya sido bloqueada, así como también verificar los tiempos de exposición dado que éste permite a la forma mutagénica activa alcanzar la

población de células blanco próximas a la división. Por ello se requieren de dos o más muestras normalmente (Macgregor *et al.*, 1990).

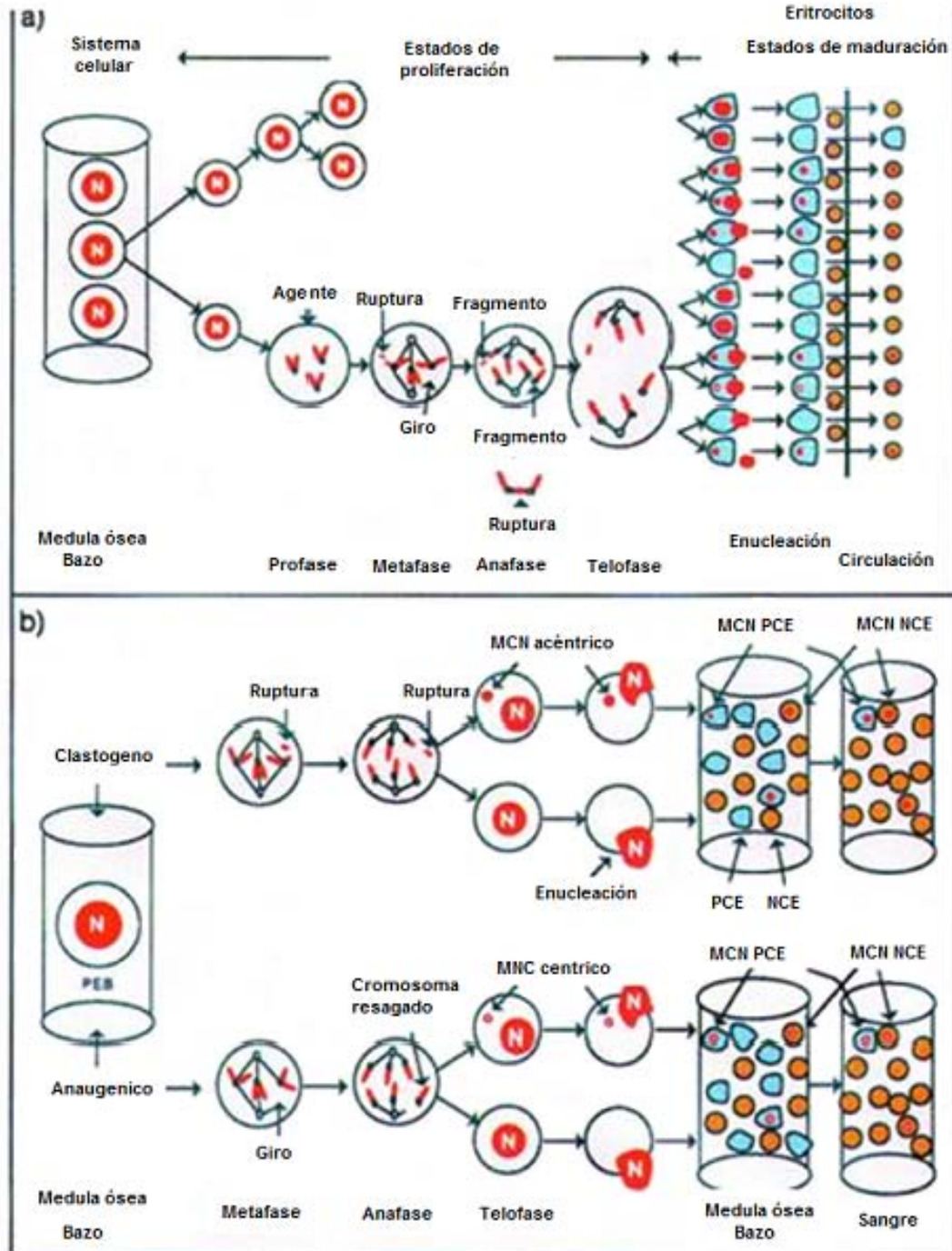


Fig. 2. Mecanismo de formación de los micronúcleos en medula ósea de ratón por acción de una agente clastógeno (Tomada de Krishna y Hayashi, 2000).

1.2. Pruebas de MCN en ratón

De acuerdo con Macgregor y colaboradores (1990), el tiempo de vida de un eritrocito en ratón es de 30 días y considera que el ciclo celular es de 10 a 20 horas, el lapso que transcurre de la división a la enucleación es de 6 horas y el tiempo de los eritrocitos policromáticos (EP) en medula ósea es de 24 horas.

Cuando se trata de un estudio subcrónico (90 días) o crónicos (2 años), las células a analizar son los eritrocitos normocromáticos (EN), al parecer es posible alcanzar una tasa estable cuando se ha tenido 45 días de exposición, pues la frecuencia de MCNEP tanto de sangre como en medula ósea es igual a la frecuencia en EN circulantes (Macgregor *et al.*, 1990).

En ensayos agudos, en donde el clastógeno actúa rápidamente y no presenta un efecto acumulativo, el régimen de exposición generalmente recomendado para una prueba de rutina es de una sola administración o bien dos con 24 horas de diferencia entre ellas (Hayashi *et al.*, 2000), pues con ello se asegura que el compuesto a probar actúe en las células dentro de su periodo de maduración. Si el tejido a analizar es medula ósea, la información se mantendrá en ella por 2 días aproximadamente, pero si se trata de realizar el estudio en sangre periférica (Fig. 3) se necesitaran 24 horas más para tener un índice estable, pues es éste el tiempo requerido para remover los EP de medula hacia sangre. En caso de que el compuesto a analizar tenga un efecto acumulativo o su acción sea lenta se requiere de un tiempo de dosificación más largo (Mac Gregor *et al.*, 1990).

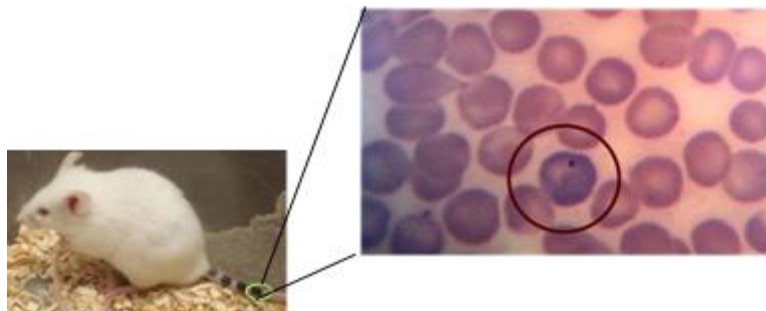


Fig. 3. Prueba de micronúcleos de sangre periférica de ratón, se indica mediante un círculo a un MCNEP.

1.2.1. Importancia de la prueba de micronúcleos

Los efectos carcinógenos y el daño genotóxico son una preocupación actual ya que son problemas cada vez más frecuentes en la población humana y que en cierta manera este aumento está relacionado por la exposición a los agentes ambientales como el aire, la dieta, el lugar de trabajo, etc. Esto propicia que cada vez sean más necesarios los indicadores de daño al DNA para determinar la extensión con la cual las exposiciones contribuyen a un daño genotóxico a los humanos (Scmid, 1975; Macgregor *et al.*, 1990). Por lo que han desarrollado una gran variedad de experimentos y entre ellos se encuentra la prueba de MCN. Dentro de las ventajas de esta técnica se incluyen: la facilidad y rapidez, la posibilidad de probar un solo químico sin otros compuestos, la abundancia de células analizables en diferentes períodos del ciclo celular y el que los MCN formados durante la división celular persisten al menos durante la siguiente interfase. Además, la prueba no deja lugar a dudas sobre el daño producido, pues lo que se observa como MCN es claramente una pérdida de ADN. Por otro lado, la prueba no detecta agentes que no producen pérdidas de material genético o de rezagos en la anafase, y tampoco es útil en poblaciones celulares que no se dividen. Los animales en general exhiben una gran variación en las frecuencias de MCN espontáneos en la sangre periférica, que van de sumamente bajas (cerca de cero) a un buen número (más de 5); eso depende de la capacidad del sistema retículo endotelial, principalmente en el bazo, que es el encargado de retirar a los MCN de la circulación. Por tanto, de la eficiencia de este órgano depende la cantidad de MCN que se puedan observar en la circulación. Es muy importante reconocer que especies animales presentan MCN espontáneamente, ya que en esas especies el control que ejerce el bazo es menor, y, por consiguiente, cuando estos organismos son expuestos a genotóxicos, los MCN se incrementan de manera significativa en sus eritrocitos; es por ello que los organismos con tales características pueden ser bioindicadores naturales (Krishna y Hayashi, 2000).

2. Eritropoyesis

El proceso de eritropoyesis y el mecanismo de formación de MCN *in vivo* se muestran en la figura 4.

El eritrocito es un vehículo para el transporte de la hemoglobina (Hb), la cual se produce en las células precursoras de los eritrocitos, los normoblastos. La función de la Hb consiste en transportar oxígeno y dióxido de carbono dentro del organismo. Se considera que ciertas influencias micro ambientales inducen a la célula madre hematopoyética pluripotencial a convertirse en la progenie eritroide diferenciada. Se ha establecido que existen dos tipos de células productoras de eritrocitos, las unidades formadoras en estallido eritroides (UFE-E), que son la forma más precoz y responden al estímulo de la interleucina 3 (IL-3) y la eritropoyetina. Las unidades formadoras de colonias eritroides (UFC-E) que se originan de las anteriores y responden a concentraciones bajas de eritropoyetina, estas células forman los pronormoblastos. El pronormoblasto es el primer precursor eritroide reconocible al microscopio, presenta un núcleo prominente que se tiñe intensamente con colores basófilos y tienen un tamaño aproximado de 20 micras, cuando éste se divide produce dos normoblastos basófilos que son de menor tamaño. Estas células presentan una tinción nuclear que da la apariencia de una rueda con radios, la cantidad de citoplasma corresponde al 25% del total de la célula y es muy basófilo por la cantidad de RNA (Henry, 1993).

Después de la mitosis del normoblasto basófilo se presenta una policromasia en la célula debida a la producción de Hb, por lo que las células resultantes son conocidas como normoblastos policromáticos; su tamaño es menor al de su precursor, el núcleo ocupa la mitad del volumen celular y su cromatina está moderadamente condensada y se colorea con intensidad con colorantes. Esta célula sufre dos mitosis que dan como resultado la producción de normoblastos ortocromáticos, los cuales presentan un núcleo pequeño y denso (picnótico), citoplasma abundante con una gran concentración de Hb y pocos polirribosomas. En este estadio ya no hay división mitótica y el núcleo es expulsado por movimientos ondulantes, la célula se divide inequitativamente resultando una

porción pequeña, la cual contiene al núcleo y un poco de citoplasma con Hb (fagocitada rápidamente por células del retículo) y una porción mayor que se convierte en reticulocito (Viana, 2010).

Durante el proceso de maduración se producen 3 o 4 divisiones mitóticas en un período de 3 días, lo cual origina la producción de 16 reticulocitos por cada normoblasto. Los reticulocitos son anucleados y mayores que los hematíes maduros, y antes de ser liberados permanecen por uno o dos días en el estroma de la medula ósea y se mantiene aproximadamente un día en circulación; en ellos aún se sintetiza Hb por lo que presentan una coloración policromatófila, ya que contienen ribosomas residuales, mitocondrias y otros organelos que son eliminados hasta la maduración eritrocítica (Rodríguez, 2010).

Los eritrocitos en el humano permanecen 120 días en circulación, durante este tiempo envejecen gradualmente disminuyendo sus diversas actividades enzimáticas y finalmente son destruidos por las células fagocíticas del sistema retículo endotelial (Rodríguez, 2010).

En roedores adultos los órganos hematopoyéticos son la medula ósea y el bazo que contienen las células principales de la eritropoyesis con estados de proliferación y maduración. Durante la proliferación, las células continúan dividiéndose y con el tiempo al ser administrado un agente puede actuar y causar daño cromosómico, ocasionado ruptura e intercambio y también interactuar macromoléculas relacionadas con la función de disyunción de la cromatide. Durante la maduración el eritroblasto se desarrolla en EP donde el núcleo principal es expulsado y cualquier MCN que haya sido formado puede permanecer en alguna parte del citoplasma. Con el tiempo perderá RNA y contener principalmente Hb y convertirse en un EN. Estos dos tipos de eritrocitos se tiñen diferencialmente tanto en medula ósea, bazo y compartimentos sanguíneos (Krishna y Hayashi, 2000).

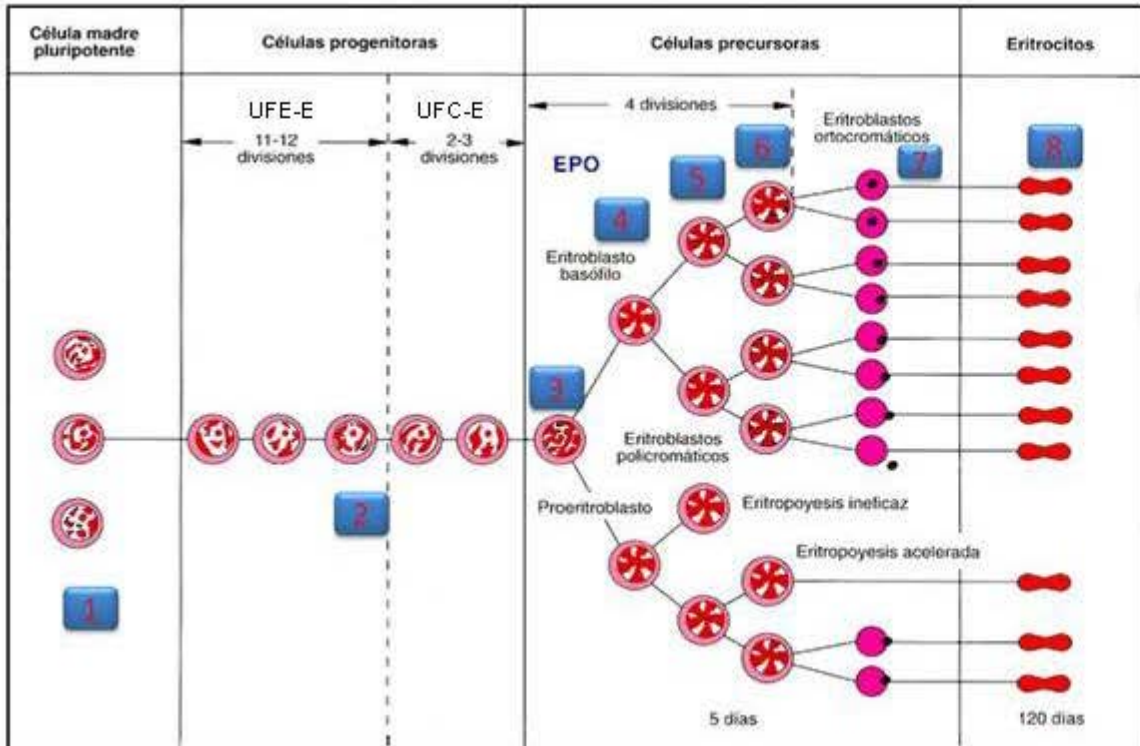


Fig. 4. Proceso eritropoyético (Tomada de <http://www.iqb.es/hematologia/atlas/eritropoyesis.gif>).

1. Células pluripotenciales.
2. Células que responden al estímulo de eritropoyetina (UFE-E Y UFC-E).
3. Pronormoblastos.
4. Normoblastos basófilos.
5. Normoblastos policromáticos
6. Normoblastos ortocromáticos.
7. Reticulocitos.
8. Eritrocitos.

2.1. Eritrocitos policromáticos

El hecho de que en un estudio agudo se monitoreó la presencia de MCN en MCNEP, se debe a que éstas son células jóvenes (reticulocitos) recientemente liberadas a la circulación y que contienen RNA, así como también conservan parte del aparato ribosómico para terminar la síntesis y constituir de esta manera una célula madura. Estos se caracterizan por presentar una coloración mezclada de

basofilia y eosinofilia, por lo que se tiñen ligeramente de azul o gris-azulado con Giemsa, por lo general son un poco mayores que los EN (Fig. 5) y proceden de normoblastos que pierden su núcleo antes de que la hemoglobinización del protoplasma sea completa (Krishna y Hayashi, 2000). El aumento en su número con respecto a los valores normales indica una eritropoyesis aumentada. Debido a que son células producidas y liberadas durante el tiempo de estudio, constituyen la manera más eficaz de evaluar en ellas la afección de la actividad de la medula, así como la capacidad clastogénica de los compuestos en corto tiempo (Macgregor *et al.*, 1990).

El número de EP en circulación es en general muy bajo, en humanos representan apenas el 1 o 2% del total de los eritrocitos, sin embargo cuando esta tasa aumenta considerablemente se pueden tener alteraciones como en los casos de anemia grave, eritropoyesis aumentada por pérdida celular a causa de hemorragias o en casos de reticulocitosis. En la prueba de MCN el aumento puede deberse al efecto citotóxico de la sustancia, que obliga al organismo a acelerar el proceso eritropoyético (Suzuki *et al.*, 1993).

La eritropoyetina es el regulador para la formación de eritrocitos en los mamíferos, el aumento en la circulación de esta hormona puede ser ocasionado por estados anóxicos por falta de oxígeno atmosférico, disminución del volumen sanguíneo, la concentración deficiente de Hb o que ella se encuentra alterada. La ingesta de cobalto, produce un estado anóxico en el riñón, resultando en la producción de eritropoyetina y por lo tanto acelerando la eritropoyesis en medula ósea, por lo que se registra un incremento en la tasa de EP (Suzuki *et al.*, 1993).

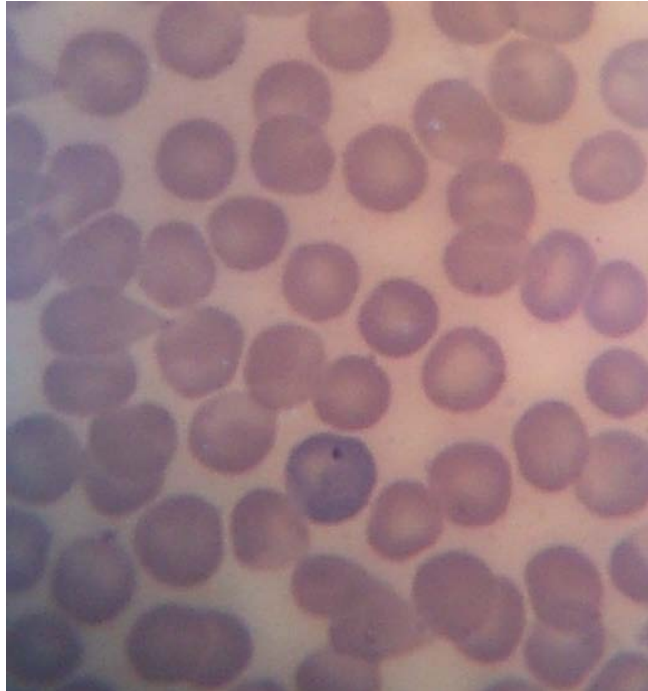


Fig. 5. Eritrocitos policromáticos coloración azul o moradas y eritrocitos normocromáticos de Coloración rosa. 100X.

2.1.1. Inclusiones eritrocitarias

En algunos casos los eritrocitos presentan cuerpos de inclusión, que son visibles cuando se tiñen con Giemsa o Wright, estos cuerpos aparecen en algunos casos cilíndricos.

a) Corpúsculos de Howell-Jolly:

Los cuerpos de Howell-Jolly son remanentes nucleares compuestos por cromatina nuclear picnótica, aparecen como inclusiones esféricas y excéntricas de tamaño entre $1\mu\text{m}$ y $2\mu\text{m}$. Son basófilos y se tiñen intensamente con los colorantes de Romanovski, Giemsa (Manascero, 2003). Este es el nombre que se les da a los MCN en hematología (Fig. 6) (Krishna y Hayashi, 2000).

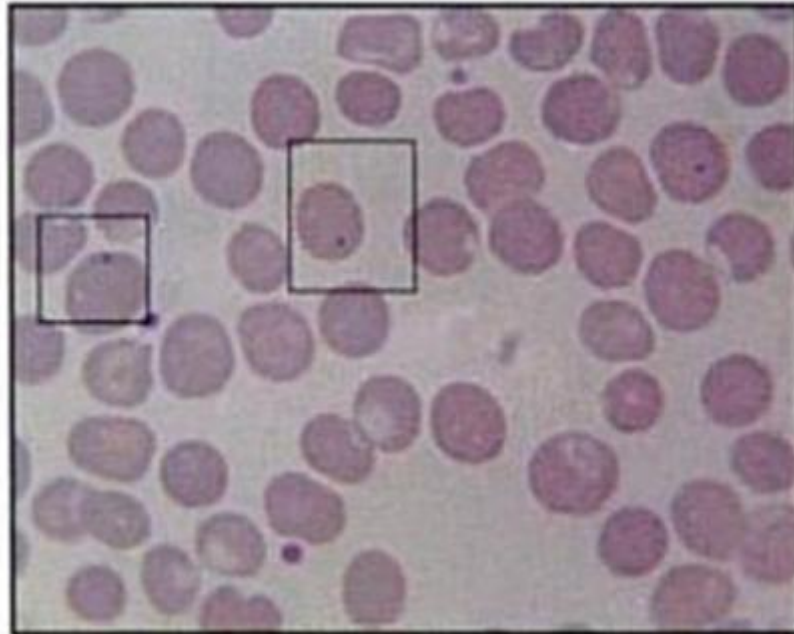


Fig. 6. Cuerpos de Howell-Jolly. 100X

3. *Metabolismo xenobiotico*

Xenobiótico (XBs) es un término genérico que se asigna a toda sustancia que ingresa a nuestro organismo a través de diferentes vías y es capaz de ocasionar alteraciones en diferentes rutas metabólicas, sea en forma inmediata o a mediano o largo plazo. Ante esta agresión, el organismo recurre a un complejo sistema que realiza la biotransformación de XBs que comprende reacciones de oxidación, reducción, hidrólisis, conjugaciones con metabolitos celulares, etc. cuya finalidad es la formación de productos no tóxicos o de baja toxicidad celular y que además sean de fácil excreción (Suárez, 1995).

Los organismos contienen un número de sistemas enzimáticos capaces de biotransformar compuestos XBs, al igual que metabolizan los compuestos endógenos para convertirlos en desechables, para transformarlos en otros más hidrosolubles, que sean más fácilmente excretables. Las biotransformaciones pueden inducir considerables cambios en la actividad biológica de los XBs. Si esta actividad decrece, el proceso se denomina de bioinactivación (detoxicación) y si

aumenta se denomina bioactivación (activación). Así pues, los efectos tóxicos de los compuestos exógenos, frecuentemente no provienen de los compuestos patrón sino de los metabolitos reactivos formados a partir de ellos dentro de las células. Estas biotransformaciones de compuestos relativamente inertes a metabolitos muy reactivos con una toxicidad intrínseca mayor que la de los compuestos originales se denomina activación metabólica, bioactivación o toxificación (Bioactivación y detoxicación, 2011).

3.1. Reacciones de biotransformación

Las reacciones de biotransformación son conversiones enzimáticas de sustancias xenobióticas lipofílicas hacia productos hidrofílicos, generalmente, más eliminables o excretables. El conjunto de reacciones de biotransformación de XB suele agruparse en dos fases: I y II (Suárez, 1995).

Un primer conjunto de reacciones, en las que la biotransformación es la conversión de compuestos lipofílicos (no polares) en compuestos más polares y por lo tanto algo más solubles en agua, mediante las reacciones llamadas de FASE I, (oxidaciones, reducciones e hidrólisis). Muchas de estas reacciones tienen lugar bajo la catálisis de enzimas de los sistemas llamados oxidasas de función mixta (OFM), distribuidas principalmente en hepatocitos. Estas reacciones producen compuestos que pueden ser más, igual o menos tóxicos que sus predecesores, aunque si es frecuente que sean más reactivos, lo que suele conllevar una mayor capacidad tóxica. Las oxidaciones incluyen todas las monooxigenasas dependientes del citocromo P-450, las monooxigenasas que contienen nucleótidos de flavina y otras (Bioactivación y detoxicación, 2011).

Las reacciones de FASE II son reacciones de conjugación (glucuronidación, sulfonación y conjugación con GSH – con formación de Ac. Mercaptúrico-), donde los XBs polares, son conjugados con sustancias endógenas hidrofílicas (ac. glucurónico, sulfato, glutatión). Estas reacciones enzimáticas están encaminadas a aumentar aún más la hidrosolubilidad de sus sustratos y por lo tanto hacerlos más

fácilmente excretables por el organismo. Además la mayor parte de los derivados conjugados tienen muy baja actividad biológica, por lo tanto muchas reacciones de la fase II son reacciones de bioinactivación en procesos de detoxificación (Bioactivación y detoxificación, 2011).

4. *Psittacanthus calyculatus* (Muérdago)

La familia Loranthaceae comprende especies parásitas y hemiparásitas de angiospermas y gimnospermas distribuidas ampliamente en diversas comunidades vegetales del país, principalmente en las zonas boscosas. Estas especies son conocidas como “muérdagos”, y dependen en gran medida de la planta que están parasitando para poder vivir; introducen sus raíces en las partes aéreas del hospedante, extrayendo así sus nutrientes (García-Regalado, 1998).

Las especies de este género también son llamadas “verdaderos” y son plantas dicotiledóneas, siempre verdes, a las que también se les dice, en distintos lugares de América Latina, “injerto”, “matapalo”, “seca palo”, “palo de caballero”, “hierba de pájaro”, “planta de la liga”, entre otros nombres (Rivas, 2009). En general, tienen un tronco corto y ramas abundantes y repetidamente ahorquilladas, de manera que forman ya sea una densa mata que cuelga del árbol parasitado o bien racimos que cubren la copa del árbol (Rivas, 2009).

4.1.1. Importancia de *Psittacanthus calyculatus* y justificación de estudio

En la herbolaria se utiliza toda la planta del muérdago (*P. calyculatus*), desecada y triturada, como hipotensora, vasodilatadora, diurética, cardiotónica y antiespasmódica, sin embargo si se consumen en dosis altas puede llegar a causar la muerte, o al menos serios problemas de salud. Kim Coder señala que la toxicidad del muérdago varía de acuerdo con la especie del árbol sobre el cual creció (citado por Rivas, 2009).

Psittacanthus calyculatus tiene un amplio uso para tratar enfermedades cardiovasculares, así mismo es empleada en la medicina tradicional como relajante, anticancerígeno y contra la hipertensión (Solís y Gómez, 2005).

En 1920, Rudolf Steiner propuso el uso del extracto acuoso de muérdago como parte de la terapia contra el cáncer, dado su efecto citotóxico. Actualmente, esta terapia continúa bajo estudio y experimentación, ya que se han registrado efectos adversos citado por Rivas, 2009.

Los preparados de muérdago por mencionar el más utilizado el europeo (*Viscum album*) se encuentra entre los fármacos más prescritos a los pacientes con cáncer en Europa. Sus partidarios sostienen que los extractos de muérdago estimulan el sistema inmunológico, incrementan la supervivencia, mejoran la calidad de vida y reducen los efectos adversos de la quimioterapia y radioterapia en los pacientes con cáncer. Es por esto que el estudio tuvo el siguiente planteamiento del problema e hipótesis de trabajo:

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

¿El extracto de *Psittacanthus calyculatus* con propiedades hipoglucemiantes es clastogénico y citotóxico?

HIPÓTESIS

Si el extracto de *Psittacanthus calyculatus* provoca genotoxicidad en ratones CD1, entonces su sistema metabólico de biotransformación del roedor reaccionará ante los compuestos del extracto para convertirlos en un mutágeno.

OBJETIVO GENERAL

Determinar el posible efecto clastógeno y citotóxico del extracto acuoso de *Psittacanthus calyculatus* en sangre periférica de ratón CD-1 mediante la prueba de micronúcleos.

OBJETIVOS PARTICULARES

- ▲ Cuantificar la frecuencia de eritrocitos policromáticos con MCN (% MCNEP o índice de genotoxicidad) en sangre periférica de ratón cepa CD1 expuestos a la concentración de 200 mg/Kg y 400 mg/Kg de peso del extracto acuoso de *Psittacanthus calyculatus*.
- ▲ Establecer la frecuencia de eritrocitos policromáticos (EP) y eritrocitos normocromáticos (EN) para determinar el índice de toxicidad utilizando la concentración de 200 mg/Kg y 400 mg/Kg de peso del extracto acuoso de *Psittacanthus calyculatus* en sangre periférica de ratón cepa CD.

MATERIAL Y MÉTODOS

4.1. Material biológico

Se utilizaron 100 ratones machos de la cepa CD-1 de 5 y 6 y 4 y 7 semanas de edad de aproximadamente 25-30 g de peso. Estos organismos fueron proporcionados por el Bioterio de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala. Los ratones se mantuvieron en condiciones de laboratorio a 21 ± 2 °C en un ciclo de luz-oscuridad (12:12 hs.), con acceso a un alimento especial para roedores y agua *ad libitum* durante la semana de aclimatación y en el experimento.

4.2. Métodos

Para la evaluación de eritrocitos policromáticos con micronúcleos (MCNEP) inducidos por el extracto acuoso de *Psittacanthus calyculatus* se procedió a realizar los siguientes pasos:

4.3 Preparación del extracto acuoso de *Psittacanthus calyculatus*

El extracto acuoso de *Psittacanthus calyculatus* fue proporcionado por el Dr. Guillermo Avila Acevedo responsable del Laboratorio de Fitoquímica de la UBIPRO de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala UNAM y colaboradores.

Psittacanthus calyculatus se recolectó del hospedero el mezquite (*Prosopis juliflora*) ubicado a un costado del Km 3 de la carretera Chupicuaro-Jerécuaro en el estado de Guanajuato, en las coordenadas 100°34' y 101°00' Latitud Oeste; 20°13' y 19°54' Latitud Norte, situado a 1860 msnm.

La obtención del extracto se llevó a cabo por el método de percolación donde se emplearon 100 g de injerto triturado, a los que se le hicieron pasar tres tipos de solventes (hexano, acetato de etilo y metanol). Los extractos de cada polaridad se concentraron a presión reducida en un rotavapor hasta obtener los sólidos totales.

El extracto metanólico fue seleccionado para realizar este estudio por poseer las siguientes propiedades: es soluble en agua destilada, además se le atribuyen diversas propiedades medicinales como relajante, anticancerígeno, hipoglucemiante y contra la hipertensión (Solís y Gómez, 2005).

4.4. Preparación de las concentraciones

Las soluciones del extracto acuoso de *P. calyculatus* se prepararon para administrárselas vía intraperitoneal a los ratones, las dosis fueron 200 mg/Kg y 400 mg/Kg de peso (Martínez, 2010). Las personas la utilizan en infusión contra enfermedades cardiovasculares, y son empleadas en la medicina tradicional como relajante, anti cancerígeno y contra la hipertensión (Solís y Gómez, 2005).

4.5. Administración y distribución de los ratones

Los 100 ratones utilizados fueron distribuidos equitativamente en dos experimentos, es decir con 50 roedores cada uno.

- a) Experimento 1.** Se emplearon 50 ratones CD-1 de 5 y 6 semanas de edad distribuidos en 5 lotes de 10 ratones cada uno, en una distribución de 5:5 para aplicar las dosis de 200 mg/Kg y 400 mg/Kg de peso del extracto acuoso. Los ratones fueron marcados previamente para su identificación (Fig. 9). Una vez ordenados el lote 1 fue designado como control negativo, con acceso durante el experimento a un alimento especial para roedores y agua *ad libitum*. El lote 2 correspondió al control positivo en donde se aplicó a los ratones de forma intraperitoneal ifosfamida en una dosis de 40 mg / 10 mL. A los lotes 3, 4 y 5 se les administró una dosis única de 200 mg/Kg y 400 mg/ Kg de peso del extracto por vía intraperitoneal, en tiempos de exposición diseñados de la siguiente manera 24, 48 y 72 hs, respectivamente.

- b) Experimento 2.** Se llevó a cabo de la misma manera que el anterior, únicamente que en este diseño se emplearon roedores de 4 y 7 semanas de edad. Todos los lotes tuvieron acceso a un alimento especial para roedores y agua *ad libitum* (Fig. 9).



Fig. 9. Diseño experimental.

4.6. Toma de muestra

Transcurrido el tiempo de exposición se tomaron muestras por triplicado de sangre periférica de la parte terminal de la cola del ratón. Se depositó una gota de sangre en un portaobjetos previamente desengrasado y limpio, realizando inmediatamente un frotis sanguíneo. Las preparaciones se dejaron secar al aire y se les etiquetó con el número del lote y ratón.

4.7. Fijación de laminillas

Después se procedió a la fijación de las células sanguíneas utilizando metanol absoluto durante 5 minutos y se dejaron secar a temperatura ambiente.

4.8. Tinción con Giemsa al 5%

Para la tinción de las laminillas se procedió a aplicar una capa delgada del colorante Giemsa al 5% durante un lapso de 7 a 8 minutos, posteriormente se les agregó el buffer de fosfatos Sörensen de pH 6.8, dejándolo actuar por otros 10 minutos, transcurrido este tiempo se enjuagaron con agua corriente a chorro y finalmente se dejaron secar al aire.

4.9. Observación al microscopio

Las observaciones que se realizaron consistieron en evaluar los siguientes parámetros:

- a) El criterio que se tomó para diferenciar a los EP y EN fue la tinción diferencial que se observa en el microscopio óptico utilizando el objetivo de inmersión (100x). Los EN se observan de color rosa, mientras que los EP presentaron una coloración azulada-morada.
- b) Se contabilizaron 2000 eritrocitos totales por laminilla para ver la relación entre EP y EN y para observar la frecuencia de células MCNEP, las cuales se aprecian como corpúsculos redondos, pequeños, bien definidos y con una coloración purpura.

5. Análisis estadístico

El índice de toxicidad (%) y el índice de genotoxicidad (%) de acuerdo al método usado por Hayashi *et al.*, 2000 y Lewińska *et al.*, 2007. Se determinó el posible efecto tóxico y genotóxico del extracto acuoso de *Psittacanthus calyculatus* empleando las siguientes fórmulas:

$$\text{Índice de citotóxicidad (\%EP)} = \frac{\text{No. de eritrocitos policromáticos}}{2000 \text{ células totales}} \times 100$$

$$\text{Índice de genotoxicidad (\%MCNEP)} = \frac{\text{No. de MCN eritrocitos policromáticos}}{2000 \text{ células totales}} \times 100$$

Así mismo se realizó un análisis de varianza multifactorial $\alpha = 0.05$ y de dos factores. Los datos fueron analizados con el programa estadístico Minitab V.15.

RESULTADOS

Como parte inicial del estudio se describe el ANÁLISIS ESTADÍSTICO DESCRIPTIVO I, en donde se emplea la prueba de ANOVA de dos factores ($p < 0.05$), que incluye el control negativo y los tratamientos.

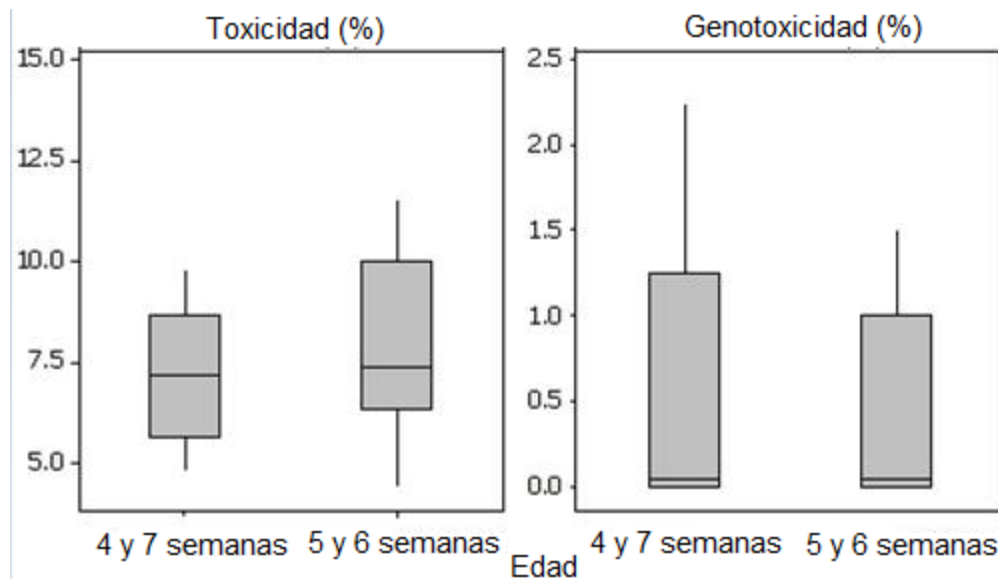
De acuerdo con los resultados obtenidos, se observó que los animales de 5 y 6 semanas de edad presentaron una tendencia al aumento en la relación de EP y EN pero no es significativo, ya que sus valores mínimo, mediana y máximo difieren de los roedores de 4 y 7 semanas de edad, así mismo en ambas edades no hubo efecto genotóxico, como se puede apreciar en los datos. Al aplicar el análisis estadístico de estos datos se determinó que no hay diferencias significativas ($p < 0.05$) en ninguna de las edades estudiadas (tabla 1 y gráfica 1).

Tabla 1. Toxicidad (%), genotóxicidad (%) de acuerdo a la edad de los ratones.

Variable	Edad semanas	Media	SE Media	St Dev	Coef. Var.	Mínimo	Q1	Mediana	Q3	Máximo
(% T)	4 y 7	7.30	0.35	1.95	26.70	4.8	5.63	7.15	8.6	13.7
	5 y 6	7.93	0.38	2.10	26.48	4.4	6.32	7.35	10.0	11.5
(% G)	4 y 7	0.50	0.12	0.69	139.03	0	0	0.05	1.25	2.25
	5 y 6	0.39	0.99	0.54	136.39	0	0	0.05	1.00	1.50

%T (porcentaje de toxicidad).

%G (porcentaje de gentotoxicidad).



Gráfica 1. Diagrama de caja del porcentaje de toxicidad y genotoxicidad para el factor edad.

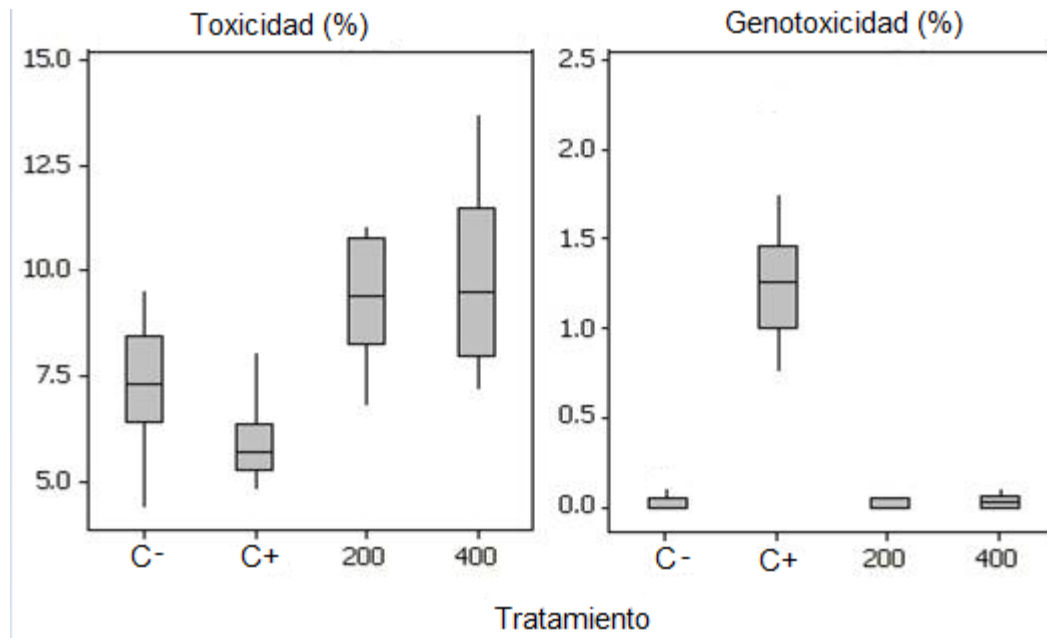
El porcentaje de toxicidad y genotoxicidad de las concentraciones aplicadas de 200 y 400 mg/Kg del extracto acuoso de *P. calyculatus* se compararon con el control negativo. Como se aprecia las diferencias del valor mínimo, mediana y máximo de las dosis aplicadas mostraron un aumento significativo en el porcentaje de toxicidad con respecto al control negativo ($p < 0.05$) (Gráfica 2). Sin embargo, se observó que estas concentraciones del extracto no provocaron un efecto genotóxico, puesto que no se registraron diferencias significativas ($p < 0.05$), es decir la frecuencia de MCN fue muy baja o nula en los eritrocitos policromáticos de los ratones CD1 (Tabla 2, Gráfica 2).

Tabla 2. Porcentaje de toxicidad y genotóxicidad de los tratamientos.

Variable	Tratamiento	Media	SE Media	St Dev	Coef.Var.	Mínimo	Q1	Mediana	Q3	Máximo
(% T)	CONTROL -	7.37	0.28	1.27	17.32	4.4	6.45	7.32	8.47	9.55
	CONTROL+	5.92	0.20	0.89	15.18	4.8	5.27	5.67	6.39	8.05
	200 mg/Kg	9.34	0.49	1.55	16.68	6.8	8.27	9.37	10.78	11.05
	400 mg/Kg	9.79	0.67	2.12	21.67	7.15	7.95	9.5	11.46	13.70
(% G)	CONTROL -	0.04	0.01	0.04	99.42	0	0	0.05	0.05	0.15
	CONTROL+	1.27	0.07	0.35	27.74	0.75	1	1.25	1.46	2.25
	200 mg/Kg	0.02	0.00	0.02	129.1	0	0	0	0.05	0.05
	400 mg/Kg	0.03	0.01	0.04	117.61	0	0	0.02	0.06	0.10

%T (porcentaje de toxicidad).

%G (porcentaje de genotoxicidad).



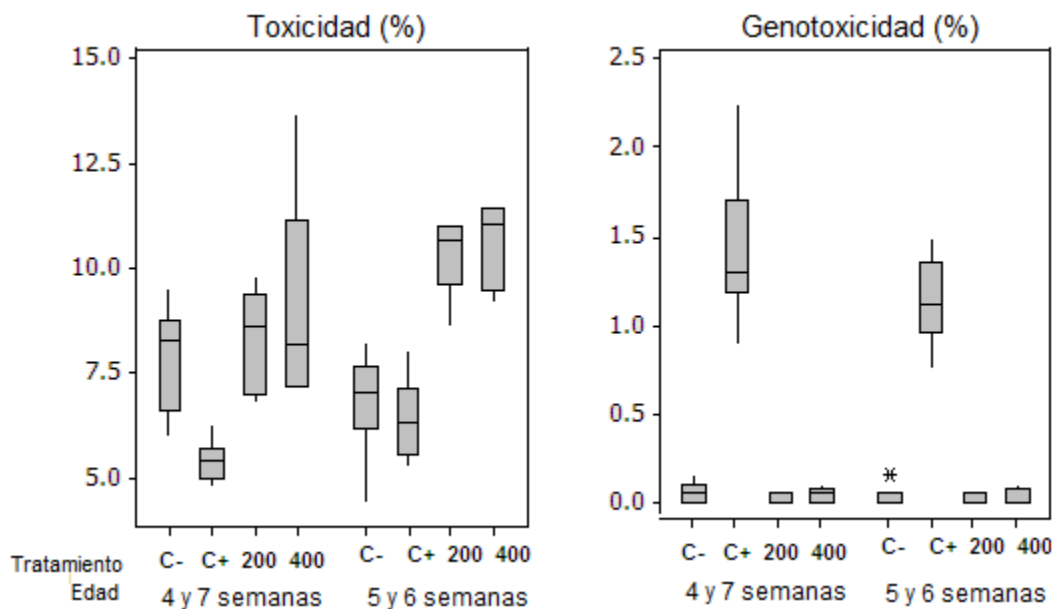
Gráfica 2. Diagrama de caja del porcentaje de toxicidad y genotoxicidad de los tratamientos.

En la tabla 3 se puede observar que entre las edades y las concentraciones empleadas de acuerdo al análisis estadístico existen diferencias significativas ($p < 0.05$), notándose que hay un mayor efecto tóxico en los ratones de 5 y 6 semanas de edad y en la concentración de 400 mg/Kg del extracto de *P. calyculatus*, con respecto al control negativo. De igual manera se puede apreciar que no hubo efecto genotóxico en ninguna de las edades y concentraciones empleadas ya que no presentaron diferencias significativas ($p < 0.05$) entre ellas (Gráfica 3).

Tabla 3. Resultados por edad y tratamientos.

Variable	Tratamiento	Media	SE Media	St Dev	Coef. Var.	Mínimo	Q1	Mediana	Q3	Máximo
(%) T 4 y 7 Semanas	CONTROL -	7.89	0.39	1.25	15.83	6	6.6	8.3	8.77	9.55
	CONTROL+	5.4	0.14	0.47	8.75	4.8	4.98	5.37	5.71	6.3
	200	8.27	0.56	1.26	15.25	6.8	6.97	8.65	9.37	9.8
	400	8.98	1.21	2.72	30.25	7.15	7.18	8.2	11.18	13.7
(%) T 5 y 6 Semanas	CONTROL -	6.86	0.35	1.13	16.57	4.40	6.2	7.05	7.65	8.25
	CONTROL+	6.44	0.29	0.93	14.54	5.26	5.6	6.34	7.15	8.05
	200	10.41	0.44	1.00	9.65	8.65	9.62	10.7	11.05	11.05
	400	10.61	0.46	1.04	9.86	9.20	9.5	11.1	11.47	11.5
(%) G 4 y 7 Semanas	CONTROL-	0.055	0.015	0.049	90.4	0	0	0.05	0.1	0.15
	CONTROL+	1.42	0.126	0.39	27.98	0.9	1.18	1.3	1.71	2.25
	200	0.02	0.012	0.027	136.93	0	0	0	0.05	0.05
	400	0.04	0.018	0.041	104.58	0	0	0.05	0.07	0.10
(%) G 5 y 6 Semanas	CONTROL-	0.04	0.01	0.045	114.87	0.0	0.0	0.05	0.05	0.15
	CONTROL+	1.13	0.07	0.244	21.60	0.75	0.96	1.12	1.35	1.5
	200	0.02	0.01	0.027	136.93	0.0	0.0	0.0	0.05	0.05
	400	0.03	0.02	0.044	149.07	0.0	0.0	0.0	0.07	0.1

%T (porcentaje de toxicidad). **%G** (porcentaje de genotoxicidad).



Gráfica 3. Diagrama de caja del porcentaje de toxicidad y genotóxicidad vs edad y tratamientos.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO DESCRIPTIVO II

La prueba de ANOVA de tres vías ó multifactorial ($p < 0.05$) se realizó únicamente a los datos obtenidos de los tratamientos de las dosis del extracto acuoso de *P. calyculatus*, para determinar cuál de éstas provoca un daño citotóxico significativo en los roedores considerando la edad y el tiempo de exposición (Tabla 4).

Tabla 4. Resultados por edad, tratamientos y tiempo.

Variable	Tiempo	Media	SE Media	St Dev	Coef. Var.	Mínimo	Q1	Mediana	Q3	Máximo
(%) T 4 y 7 semanas 200 mg	24	5.64	0.343	0.766	13.58	4.55	4.925	5.7	6.325	6.55
	48	8.27	0.564	1.261	15.25	6.8	6.975	8.65	9.375	9.8
	72	7.59	0.497	1.112	14.65	6.05	6.5	7.7	8.625	8.7
(%) T 4 y 7 semanas 400 mg	24	7.41	0.754	1.685	22.74	6	6.15	7.15	8.8	10.25
	48	8.98	1.21	2.72	30.25	7.15	7.18	8.2	11.18	13.7
	72	8.66	0.278	0.622	7.18	8	8.2	8.45	9.225	9.65
(%) T 5 y 6 semanas 200 mg	24	10.13	0.394	0.881	8.69	9	9.375	9.85	11.025	11.05
	48	10.41	0.449	1.005	9.65	8.65	9.625	10.7	11.05	11.05
	72	9.94	0.544	1.216	12.24	8.15	8.7	10.5	10.9	11.1
(%) T 5 y 6 semanas 400 mg	24	10.25	0.172	0.386	3.76	9.85	9.9	10.2	10.625	10.8
	48	10.61	0.468	1.047	9.86	9.2	9.5	11.1	11.475	11.5
	72	10.16	0.192	0.429	4.22	9.7	9.775	10.15	10.55	10.8

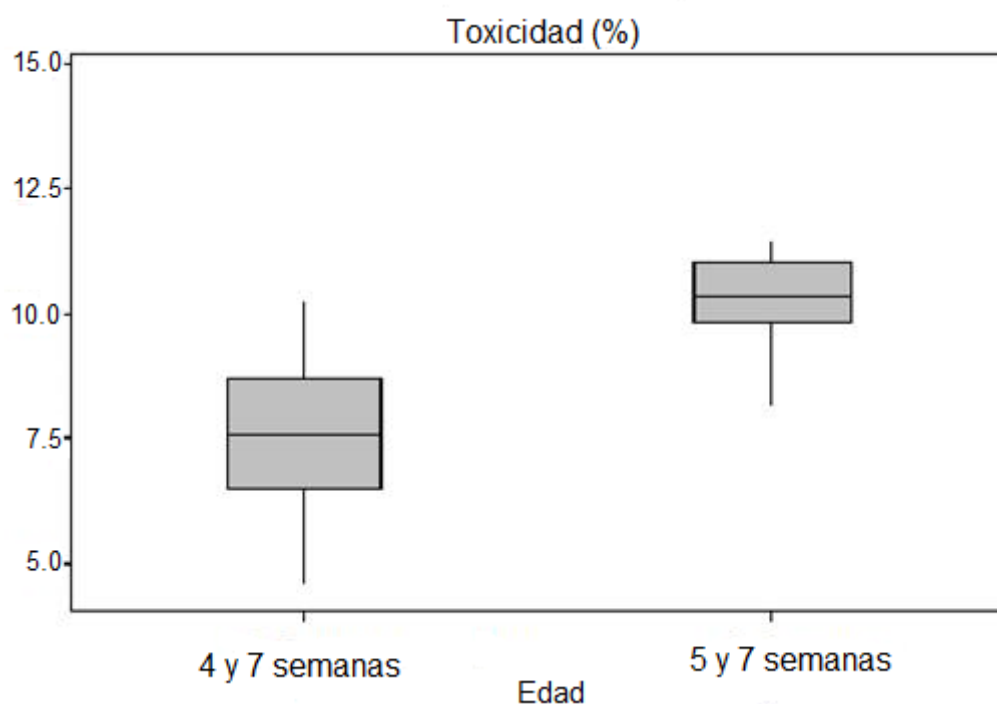
%T (porcentaje de toxicidad).

En la tabla 5 se muestra la relación de la toxicidad con la edad. Es posible observar en los animales de 5 y 6 semanas de edad tienen una media de $10.25 \pm$ DE, a diferencia de los ratones de 4 y 7 semanas de edad donde el valor de su media es de $7.75 \pm$ DE, así mismo los valores mínimo, mediana y máximos muestran diferencias significativas ($p < 0.05$) (Gráfica 4).

Tabla 5. Análisis estadístico descriptivo: toxicidad (%) por edad.

Variable	Media	SE Media	St Dev	Coef. Var.	Mínimo	Q1	Mediana	Q3	Máximo
(%) T 4 y 7 Semanas	7.75	0.325	1.782	22.97	4.55	6.488	7.525	8.663	13.7
(%) T 5 y 6 semanas	10.25	0.15	0.83	8.13	8.15	9.78	10.37	11.01	11.5

%T (porcentaje de toxicidad).



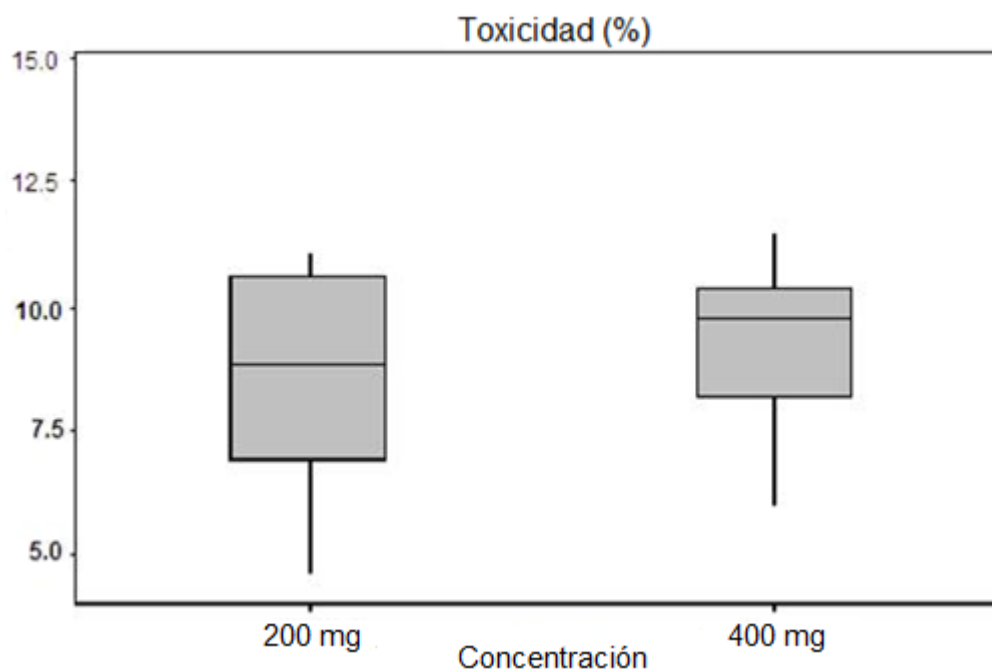
Gráfica 4. Diagrama de caja del porcentaje de toxicidad vs edad.

El grado de toxicidad de las dosis fue otra variable a comparar. La dosis empleada de 400 mg/Kg del extracto acuoso de *P. calyculatus* es ligeramente más tóxica que la de 200 mg/Kg (Gráfica 5). Los valores mínimo, mediana y máximo mostraron mayor variabilidad a diferencia de la dosis de 200 mg/Kg (Tabla 6).

Tabla 6. Análisis estadístico descriptivo: Porcentaje de toxicidad por tratamiento.

Variable	Tratamiento	Media	SE Media	STDev	Coef Var	Mínimo	Q1	Mediana	Q3	Máximo
(%T)	200 mg/Kg	8.66	0.36	1.97	22.8	4.55	6.91	8.82	10.62	11.1
	400 mg/Kg	9.34	0.31	1.715	18.35	6	8.15	9.75	10.33	13.7

%T (porcentaje de toxicidad).



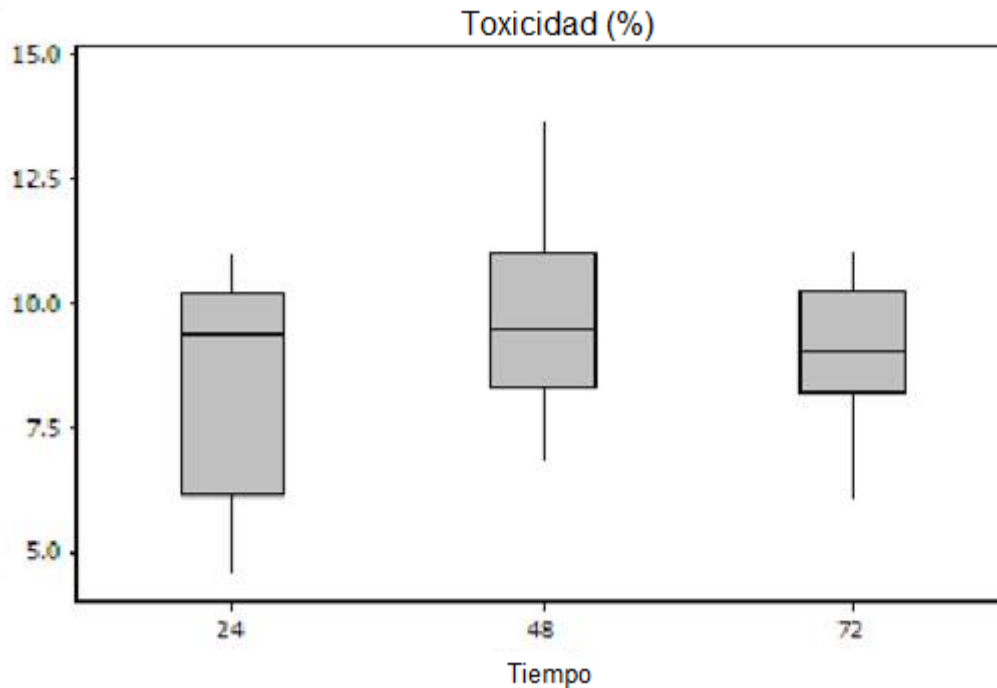
Gráfica 5. Diagrama de caja de porcentaje de toxicidad vs concentración.

Por otra parte los tiempos de exposición también fueron una variable importante para conocer el grado de toxicidad del extracto. En el presente estudio se registró una ligera toxicidad en los tiempos de exposición de 48 hs sobre las células sanguíneas del ratón CD1, en ambas edades y concentraciones, como lo muestra el aumento significativo ($p < 0.05$) de la media y sus valores mínimos, medianas y máximos con respecto a los tiempos de 24 y 72 hs (Gráfica 6, Tabla 7).

Tabla 7. Estadística descriptiva: toxicidad (%), por tiempo.

Variable	Tratamiento	Media	SE Media	ST Dev	Coef Var	Mínimo	Q1	Mediana	Q3	Máximo
(%T)	24	8.35	0.49	2.20	26.39	4.55	6.15	9.37	10.23	11.05
	48	9.56	0.40	1.82	19.1	6.8	8.31	9.5	11.05	13.7
	72	9.08	0.30	1.35	14.86	6.05	8.21	9.02	10.26	11.1

%T (porcentaje de toxicidad).

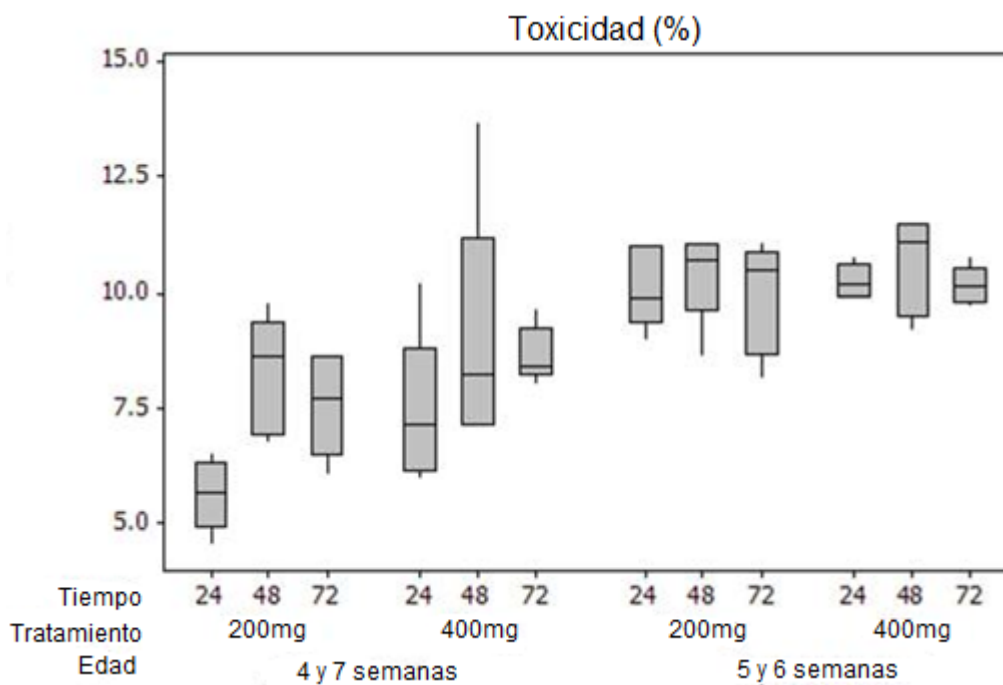


Gráfica 6. Diagrama de caja del porcentaje de toxicidad vs tiempo.

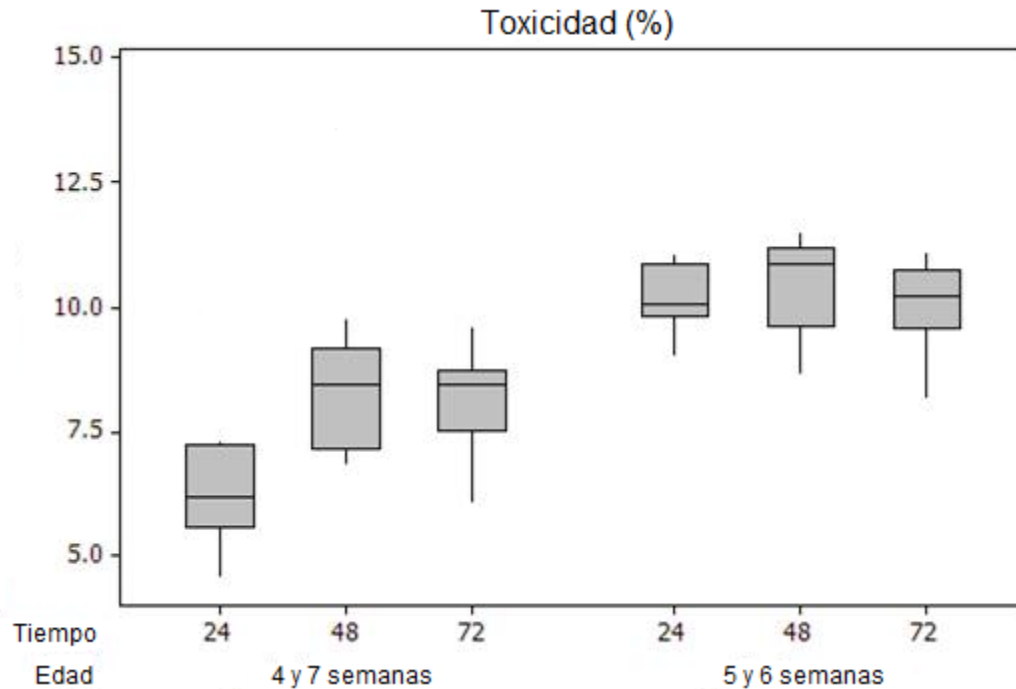
En la tabla 8, los factores más significativos del estudio para medir la toxicidad fueron edad, tratamiento y tiempo, donde de acuerdo con el análisis de varianza para la evaluación de la toxicidad (%) el valor de $p < 0.05$ difiere, por lo tanto existen diferencias significativas (Gráfica 7), así mismo para el valor de F, la variable más significativa fue el factor edad con un valor de 59.72 (Tabla 8).

Tabla 8. Análisis de varianza del porcentaje de toxicidad, usando la prueba de ajuste SS.

	DF	Seg. SS	Adj. SS	Adj. MS	F	P
Edad	1	93.126	93.126	93.126	59.72	0.0
Tratamiento	1	6.97	6.97	9.97	4.47	0.04
Tiempo	2	14.849	14.849	7.425	4.76	0.013
Edad*Tratamiento	1	3.775	3.775	3.775	2.42	0.126
Edad*Tiempo	2	10.329	10.329	5.165	3.31	0.045
Tratamiento*Tiempo	2	0.61	0.61	0.305	0.2	0.823
Edad*Tratamiento*Tiem po	2	0.856	0.856	0.428	0.27	0.761
Error	48	74.845	74.845	1.559		
Total	59	205.361				



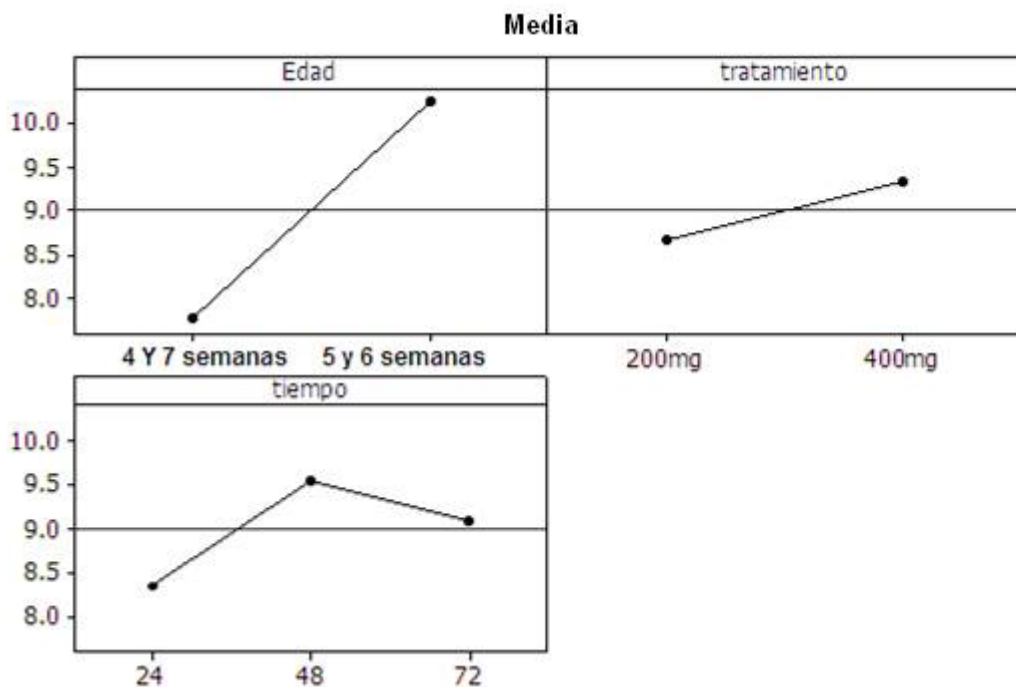
Gráfica 7. Diagrama de caja para el porcentaje de toxicidad vs edad tratamiento y tiempo.



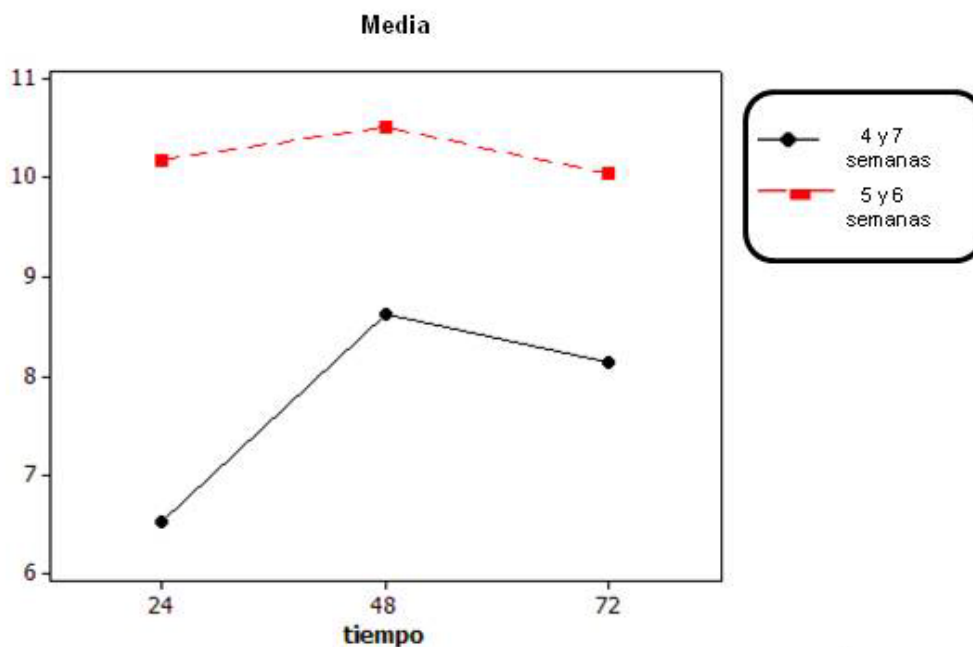
Gráfica 8. Diagrama de caja del porcentaje de toxicidad considerando la edad y el tiempo de exposición.

Por otro lado en la gráfica 7 y 8, se puede observar que los ratones de 5 y 6 semanas de edad presentan una mayor toxicidad con respecto a los de 4 y 7 semanas, así mismo es posible apreciar que a las 48 horas de exposición hay un aumento significativo ($p < 0.05$), en ambas concentraciones del extracto acuoso de *P. calyculatus* y edades.

Finalmente en las gráficas 9 y 10 se muestran las medias obtenidas de los factores edad, tratamiento y tiempo, mostrando así el efecto citotóxico del extracto acuoso de *P. calyculatus*. Con lo referente a la edad de los roedores de 5 y 6 semanas potencializan el efecto tóxico del extracto acuoso debido a que hay diferencias significativas entre las medias ($10.25 \pm DE$) respecto a la de los ratones de 4 y 7 semanas ($7.75 \pm DE$), así mismo es posible observar que la exposición en un tiempo de 48 horas y en la dosis de 400 mg/kg mostró diferencias significativas ($p < 0.05$) respecto a la de 24 y 72 hs, igualmente en la concentración de 200 mg/kg (Tablas 5, 6 y 7).



Gráfica 9. Medias de las variables edad, tratamientos y tiempo sobre el efecto del porcentaje de toxicidad del extracto acuoso de *Psittacanthus calyculatus*.



Gráfica 10. Interacción de las variables edad y tiempo sobre el porcentaje de toxicidad del extracto acuoso de *Psittacanthus calyculatus*.

ANÁLISIS DE RESULTADOS

Los resultados obtenidos en el presente estudio mostraron que el extracto de *P. calyculatus* no provoca un efecto clastógeno ni aneuploidogénico. Esto se debió posiblemente a que el sistema reticuloendotelial (SRE) particularmente del bazo y la médula ósea de los ratones fueron capaces de neutralizar al agente químico administrado, ya que las células de estos órganos son las encargadas de fagocitar a través de sus membranas todos los elementos agresivos para el organismo (sustancias tóxicas, bacterias, hongos, etc.) que penetran el intestino a través de la vena porta (Macgregor *et al.*, 1990).

Salomone y Kathleen en 1994 reportaron que un compuesto se puede considerar como citotóxico cuando el número de EP aumenta significativamente en relación con los EN. Así mismo esta frecuencia de EP también se puede ver incrementada por diversos factores entre ellos la edad de los roedores, ya que mientras más jóvenes el número de EP en circulación es más alto comparado con la índice de EP en ratones adultos, como ocurrió en la dosis de 400 mg/Kg de peso del extracto de *P. calyculathus* en ambas edades.

Por otro lado, los resultados obtenidos coincidieron con los reportados por Mac Gregor *et al.* (1990) en donde mencionan que el efecto de toxicidad en médula ósea se tiene a las 24 hs posteriores a una administración, pero que esta frecuencia disminuye a las 48 hs en este tejido, pero que en este tiempo se tiene el porcentaje de toxicidad y genotoxicidad máxima en sangre periférica, así mismo también menciona una disminución en la frecuencia de MCNEP a las 72 hs después de la administración en ambos tejidos.

Como ya se mencionó anteriormente, este ensayo se realizó en un sistema *in vivo*, por lo que posiblemente al administrar el extracto acuoso de *P. calyculatus* a los ratones, el compuesto sufrió una biotransformación, en la cual alguno de los metabolitos (taninos y ácido gálico) pudo ser capaz de producir el efecto citotóxico en la dosis de 400mg/Kg del extracto acuoso de *P. calyculatus*. Los taninos son compuestos polifenólicos, más o menos complejos que no constituyen un grupo

químico único si no que tienen una amplia variedad de estructuras moleculares. Los taninos hidrolizables o *gálicos* se hidrolizan con facilidad tanto por ácidos y álcalis, como por vía enzimática. Los taninos gálicos tienen una alta reactividad frente a las proteínas y carbohidratos por acción de la enzima esterasa, debido a que reducen la actividad de la lacasa y de la tirosinasa frente los antocianos y los polifenoles, preservando el mosto de la acción conjunta de estas enzimas con el oxígeno y que en elevadas concentraciones pueden limitar la absorción de algunos nutrientes como el hierro (Compuestos Fenólicos, 2011). El consumo elevado de taninos suele dar problemas de intoxicación debido a su alto peso molecular ya que no son absorbidos por el intestino y al ser hidrosolubles pueden ser degradados a azúcares y fenoles, algunos de estos compuestos como el pirogalol, son un producto tóxico para hígado y riñones (Mantecón *et al.*, 2011).

Posiblemente los principales responsables del efecto toxico del extracto de *P. calyculatus* en la dosis de 400mg/Kg fueron los citocromo P-450, que no son solo un tipo de enzimas, sino que en realidad son una familia de hemoproteínas presentes en numerosas especies. Se ha comprobado que las familias 1, 2 y 3 están constituidas por enzimas encargadas de las reacciones de biotransformación de xenobióticos (conjunto de procesos enzimáticos a los que se ven sometidos los xenobióticos en el organismo, en general, a su neutralización y eliminación), mientras que el resto de las familias del CYP-450s intervienen en la biosíntesis y el metabolismo de compuestos endógenos (Capdevila *et al.*, 2000). Una de las características más significativas de los P-450 que metabolizan xenobióticos es su baja especificidad, lo que permite que sean capaces de metabolizar un número casi ilimitado de substratos, principalmente a través de reacciones de oxidación, pero también de reducción e hidrólisis. Las oxidaciones catalizadas por el P-450 son reacciones de monooxigenación dependientes de NADPH y para las que se utiliza oxígeno molecular. Como consecuencia de estas reacciones los P-450 aceleran la eliminación de un gran número de fármacos y compuestos tóxicos del organismo, pero también son las responsables de la activación de toxinas o precarcinógenos (Omura, 1999).

CONCLUSIÓN

La citotoxicidad ligera del extracto de *Psittacanthus calyculatus* depende de la concentración de sus componentes químicos.

El extracto acuoso de *Psittacanthus calyculathus* no tiene un efecto clastógeno, ni genotóxico.

Así mismo, ningún ratón murió por las concentraciones agudas administradas en el presente estudio.

La edad de los animales es un factor importante para determinar la citotoxicidad ya que en el presente trabajo los roedores de 5 y 6 semanas de edad evidenciaron un mayor efecto citotóxico.

La concentración de 400 mg/Kg del extracto acuoso de *Psittacanthus calyculathus* es citotóxica.

REFERENCIAS

1. Allen J. W., B. W. Collins, A. Lori, A. J. Afshari, M. H. George, A. B. DeAngelo y J. C. Fuscoe. 2000. Erythrocyte and Spermatid Micronucleus Analyses in Mice Chronically Exposed to Potassium Bromate in Drinking Water. *Environmental and Molecular Mutagenesis*. **36**: 250-253.
2. Alteración de la información genética, 2010. http://www.bioygeo.info/pdf/16_Mutaciones.pdf (accesado en noviembre, 2010).
3. Askin C. T y A. Ö Sultan. 2007. Cytotoxic and genotoxic effects of *Lavandula stoechas* aqueous extracts. *Biología, Bratislava*. **62**:3, 292-296.
4. Attia S. M., A. M. Aleisa, S. A. Bakheet, A. A. Al-Yahya, S. S. Al-Rejaire, A. E. Ashour y O. A. A-Shabahah. 2009. Molecular Cytogenetic evaluation of the mechanism of micronuclei formation Induced by camptothecin, topotecan, and irinotecan. *Environmental and Molecular Mutagenesis*. **50**: 145-151.
5. Bioactivación y detoxicación. 2010. www2.uah.es/tejedor_bio/bioquimica_ambiental/BA-RES-6.pdf (accesado en 26 de agosto, 2011).
6. Capdevila J.H., J. R. Faick y R. C. Harris. 2000. Cytochrome P-450 and arachidonic acid bioactivation. Molecular and functional properties of the arachidonate monooxygenase. *Journal of Lipid Research* **41**: 163-181.
7. Compuestos Fenólicos. 2011. www.portalfarma.com/...nsf/.../web_fenolicos.htm (accesado el 23 de Mayo, 2011).
8. Chauhan L. K., K. Munish, N. P. Bholra, K. G. Sudhir y K. G. Shrawan. 2007. Cytogenetic effects of commercial formulations of deltamethrin and/or isoprotruron on human peripheral lymphocytes and mouse bone marrow cells. *Environmental and Molecular Mutagenesis*. **48**: 636-643.
9. Chuaqui J. B y B. S. González 2010. Manual de patología general: Inclusiones nucleares. Universidad Católica de Chile. <http://escuela.med.puc.cl/publ/patologiageneral/ManualPatologiaIndice.html>. (accesado en Octubre, 2010).
10. Deranche B. 1990. Toxicología: seguridad de los alimentos. Omega. México. 73-88, 233-247, 443-444.
11. Evans H. J.; G. J. Neary, F. S. Williamson. 1959. The relative biological efficiency of single doses of fast neutrons and gamma rays on *Vicia faba* roots and the effect of oxygen. *International Journal of radiation Biology*; **1**:216-29.

12. García Regalado G. 1998. La familia Loranthaceae (injertos) del Estado de Aguascalientes, México. *Polibotánica*. **7**: 1-14
13. González Z. G. y M. B. Gómez. 2006. Prueba de Micronúcleos. La Ciencia y el Hombre. Revista de divulgación Científica y Tecnológica de la Universidad Veracruzana. **19**(1). [http://www. Biología.edu.ar/cel_euca/regulación.htm](http://www.Biología.edu.ar/cel_euca/regulación.htm) (accesado en Enero, 2010).
14. Hayashi M. J. T., J. T. MacGregor, G. D. Gatehous, I. D. Adler, D. H. Blakey, S. D. Dertinger, G. Krishna, Morita. A. Russo y S. Sutou. 2000. In Vivo Erythrocyte Micronucleus Assay. II. Some Aspects of Protocol Design Including Repeated Treatments, Integration with Toxicity Testing, and Automated Scoring. *Environmental and Molecular Mutagenesis*. **35**: 234-252.
15. Heddle J. A. 1973. A rapid in vivo test for chromosomal damage. *Mutation Research* **18**:187-190.
16. Henry J. B. 1993. Diagnóstico y Tratamiento Clínicos por el Laboratorio. 9ª edición. Masson Salvat Medicina. Barcelona, España.
17. Iarmarcovai G., S. Bonsái, R. A. Baan y T. Orsière. 2007. Genetic polymorphisms and micronucleus formation: A review of the literature. *Mutations Research*, **658** (2008): 215-233.
18. Krishna G. y M. Hayashi. 2000. In vivo rodent micronucleus assay: Protocol, conduct and data interpretation. *Mutation Research*. **455**: 155-166.
19. Lewińska D., M. Arkusz, J. Stańczyk, E. Palus, Dziubaltowska y M. Stepnik. 2007. Comparison of the effects of arsenic and cadmium on benzo(a) pyrene-induced micronuclei in mouse bone-marrow. *Mutation Research*. **632**: 37-43.
20. Luca C. J. y A. I. Seoane. 2008. Cátedra de Genética general. Mutaciones y aberraciones cromosómicas. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de la plata. 1-14.
21. Macgregor J. T., C. M. Werh., P. R. Henika y M. D. Shelby. 1990. The *in vivo* erythrocyte micronucleus test: Measurement at steady state increases assay efficiency and permits integration with toxicity studies. *Fundamental and Toxicology*. **14**: 513- 522.
22. Manascero G. A. R. 2003. Atlas de morfología celular, alteraciones y enfermedades relacionadas. Universidad Javeriana. CEJA. Bogota, Colombia.
23. Mantecón C., J. Lasa y J. M. Gómez. 2011. Utilización de taninos en la dieta de los rumiantes. Pecuarios. www.ganaderia.com.mx/includes/pdf.asp?cve_art=641&portal=2 (accesado el 25 de mayo, 2011).
24. Martínez F. 2010. Propiedades biológicas de *Psittacanthus calyculatus* (Loranthaceae). Tesis profesional. Facultad de Estudios Superiores Iztacala. UNAM. México. 1-72.

25. Meier J. R., P. Wernsing y J. Torsella. 1999. Feasibility of micronucleus methods for monitoring genetic damage in two feral species of small mammals. *Environmental and Molecular Mutagenesis* **33**: 219-225.
26. Núñez V. R. y J. R. Escalona. 2010. Ciclo celular. Facultad de Medicina. Universidad Nacional Autónoma de México (Departamento de Embriología). México. 1-9.
27. Omura T. 1999. Forty years of cytochrome P-450. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. **266**: 690-698.
28. Remigio M. A., J. P. Ferrer, Y. V. Hurtado, C. R. Ferrelá y C. Carballo. 2007. Evaluación genotóxica del extracto hidroalcohólico de *Tamarindus indica* L. empleando el ensayo de micronúcleos en médula ósea de ratón. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*. **12**(2) http://bvs.sld.cu/revistas/pla/vol12_2_07/pla02207.12htm. (accesado en Noviembre, 2009).
29. Rivas T. D. 2009. Asociación Mexicana de Arboricultura (AMA). México. 1-32. www.arboricultura.org.mx/pdfs/ArbolAMA_2.pdf. (accesado en Agosto, 2010).
30. Rodríguez P. 2010. Línea Eritropoyética. www.2.uah.es/javier_lucio/.../CAPITULO%20I. ADN - > ARN y codones. (accesado en Enero, 2010).
31. Salamanca F. 1992. Citogenética y cáncer. Genética y Cáncer. *Gaceta Médica de México*. **128** (2):110-117.
32. Salamanca F. 1992. Citogenética humana. Ed. Médica Panamericana. México. 37-41, 43-62, 83-105.
33. Sánchez G. J. 2010. Mutaciones: la información celular. <http://es.scribd.com/doc/31947601/Mutaciones> (accesado en febrero, 2010).
34. Salomone F. M. and Kathleen H. M. 1994. Bone Marrow Micronucleus Assay. Review of the Mouse Stocks Used and Their Published Mean Spontaneous Micronucleus Frequencies. *Environmental and Molecular Mutagenesis*. **23**: 239-273.
35. Schmid W. 1975. The micronuclei test. *Mutation Research*. **31**:9-15.
36. Steiner R: Geisteswissenschaft und Medizin (20 Vorträge, Dornach 21.– 31.3 u. 1.–9.4.1920) 12 und 13. Verlag der Rudolf Steiner Nachlassverwaltung, Dornach, Schweiz, Germany. (accesado en mayo de 2010).
37. Solís G. V., Gómez S. M. 2005. Inventario de las especies de Muérdagos en la Zona Sur del Estado de Querétaro. Facultad de Ciencias Naturales. Universidad Autónoma de Querétaro. www.uaq.mx/investigacion/...VII/UAQ%20Solis%20Gracia.doc (accesado en Agosto 19, 2009).
38. Suarez C. S. 1995. Detoxificación hepática y defensa antioxidante por efecto de xenobioticos alimentarios. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Facultad de farmacia y bioquímica. Lima.

39. Suzuki Y., H. Shimizu, N. Yusuke, M. Fufumoto, H. Okonogi y K. Makoto. 1993. Micronucleus Test and Erythropoiesis: Effect of Cobalt on the induction of micronuclei by mutagens. *Environmental and Molecular Mutagenesis*. **22**: 101-106.
40. Te-Hsiu M., X. Zhou, G. F. Loarca, G. G. Arreola y S. U. Lecona. 1995. Mause-Erythrocyte Micronucleus (Mus-EMN) Assay on the Clastogenicity of Industrial Wastewater. *Review International Countant Ambient*. **11**(2): 95-98.
41. Viana M. D. 2010. Sangre y Hematopoyesis. *Histología Veterinaria*. CEU. www.uch.ceu.es/anatomia_patologica/...09/Tema%209.pdf. (accesado en enero, 2010)

APÉNDICE I.

Fotografías de muestras de sangre periférica de ratón CD-1 del estudio *in vivo* realizado.

Para poder realizar la prueba de micronúcleos, se requirió de una buena tinción diferencial (Giemsa), ya que sin ella los conteos de los eritrocitos no podrían realizarse, debido a que los eritrocitos policromáticos (jóvenes) se pueden confundir y por consiguiente un mal análisis genotóxico. Fotografías tomadas a 100x con un microscopio óptico, muestran la tinción diferencial.

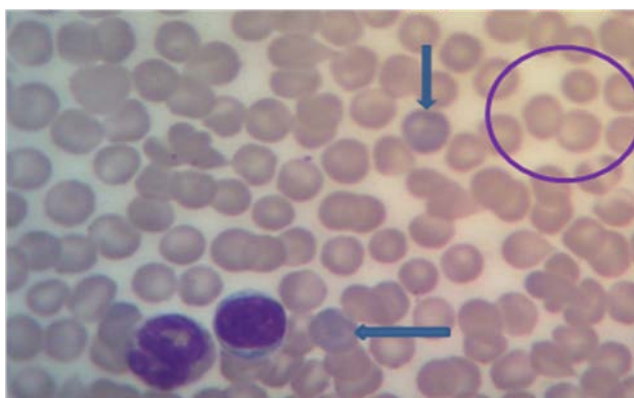


Fig. 10. Diferencia entre eritrocitos normocromáticos (círculo) y eritrocitos policromáticos (flecha). 100X tinción con Giemsa.

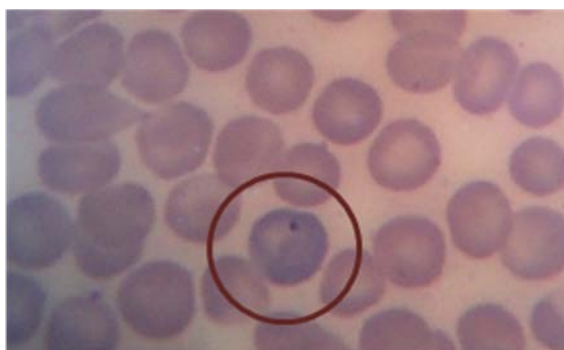


Fig. 11. Micronúcleo en un eritrocito policromático. 100X Tinción con Giemsa.

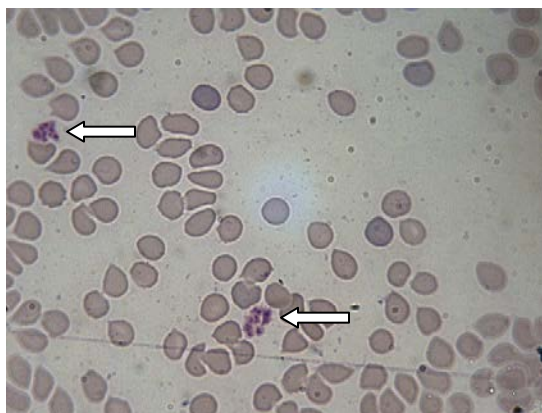


Fig. 12. En este campo es posible observar 5 eritrocitos policromáticos y 105 eritrocitos normocromáticos, también se puede apreciar la presencia de grupos pequeños de plaquetas en la imagen, señalados con flechas blancas. 100 X Tinción con Giemsa.

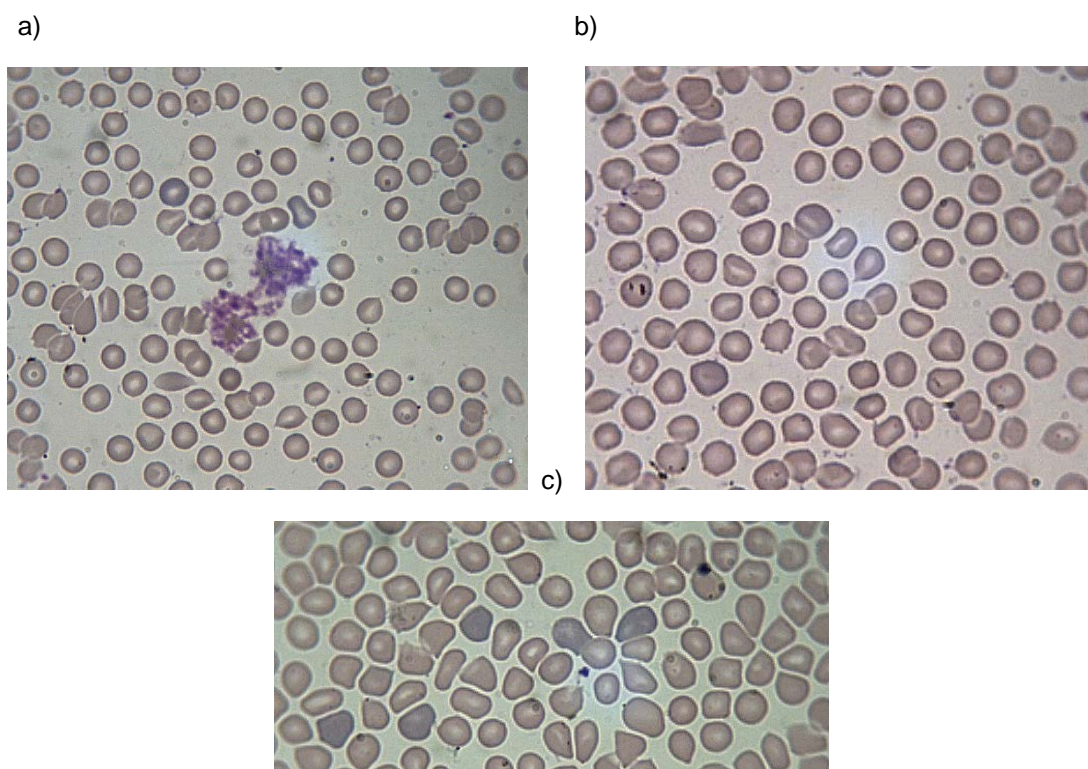


Fig. 13. En las fotografías b) y c) se muestra la distribución de los eritrocitos, en ellas también se aprecia su forma cóncava que los caracteriza, además de campos claros. En la imagen a) se aprecian dos grupos grandes de plaquetas en el centro. 100X Tinción con Giemsa.

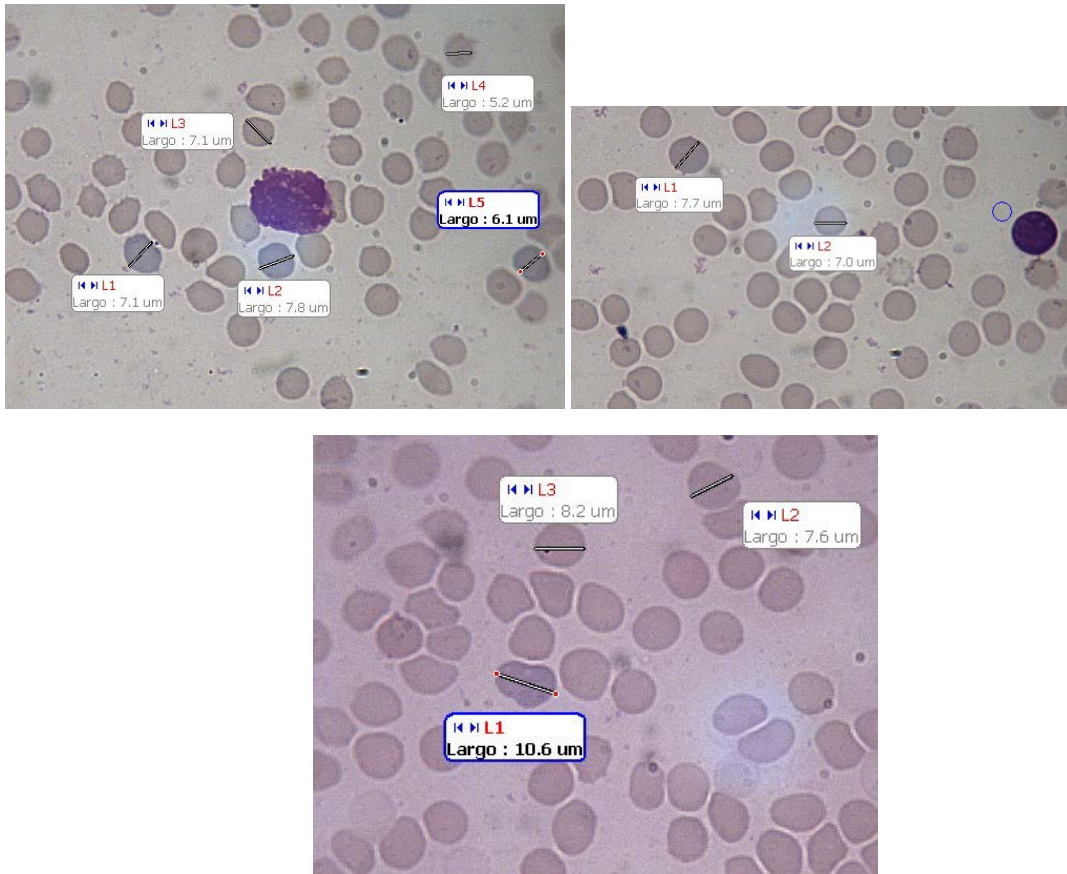


Fig. 14. Estas imágenes indican las medidas de los diámetros de los eritrocitos policromáticos y normocromáticos, observados a 100 X. Tinción con Giemsa.

APÉNDICE II.

Preparación del colorante y elaboración de la solución amortiguadora.

Preparación del colorante Giemsa

Pesar 1 gr. de Giemsa en polvo (Giemsa), medir 65 ml. de metanol y 40 ml. de glicerina. En una parrilla con agitador se colocan vasos de precipitados de 500 ml. con el metanol y poco a poco se le agregó la glicerina. Ya mezclados se le agregó el gramo de colorante y se dejó en agitación por una hora y se incubó por 24 hrs, a 60 °C.

Preparación de la solución amortiguadora o buffer de fosfatos (sol. Sorensen)

Pesar 6.0 gr., de Na_2HPO_4 y 5.0 gr., de KH_2PO_4 mezclar y aforar a un litro de agua destilada. Posteriormente se ajusta a un pH de 6.8.

ABREVIATURAS

EP: Eritrocito policromático

EN: Eritrocito normocromático

Hb: Hemoglobina

MCN: Micronúcleos

EMCN: Eritrocitos con micronúcleo

MCNEP: Eritrocitos policromáticos con micronúcleo

MCNEN: Eritrocitos normocromáticos con micronúcleo